

METHODOLOGISCHE
STUDIEN ZUM NACHWEIS
VON KATECHOLAMINEN
UND IHRER METABOLITEN
AUS LEICHENBLUT

Helena Dettmar



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0024

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Spann

METHODOLOGISCHE STUDIEN ZUM NACHWEIS VON KATECHOLAMINEN
UND IHRER METABOLITEN AUS LEICHENBLUT.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Helena Dettmar, geb. Skalik
München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. G.KAUERT
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W.SPANN

Dekan: Prof. Dr. med. W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1986

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung.....	1
1.1. Absicherung der Diagnose der eigentlichen Todesursache durch physiologisch-chemische Befunde	1
1.2. KA-Freisetzung aufgrund von Stress in lebens- bedrohenden Situationen	2
2. Biogene Amine	6
2.1. Mechanismus der KA-Freisetzung	6
2.2. Synthese der Katecholamine	7
2.3. Metabolismus der Katecholamine	9
2.4. Konzentrationsänderung während Stress	11
2.5. Postmortale Veränderungen im Stoffwechsel der Katecholamine	13
3. Problemstellung	16
4. Eigene Untersuchungen	17
4.1. Benötigte Materialien und Geräte	17
4.1.1. Materialien	17
a) Standardsubstanzen	
b) Reagenzien	
c) Trennsäulenmaterial	
4.1.2. Geräte	18
4.1.3. Biologisches Material	18

4.2. Gaschromatographischer Nachweis von Katechol-	
aminen	19
4.2.1. Die Ultrafiltration	20
4.2.2. Die Elimination von Störsubstanzen	20
4.2.2.1. Gelchromatographie	21
4.2.2.2. Ionenaustauschchromatographie	23
4.2.3. Derivatisierung	30
4.2.4. Nachderivatisierung	31
5. Auswertung	32
5.1. Ermittlung der Eichkurven	32
5.2. Untersuchung der Blutproben	41
6. Diskussion der Meßergebnisse	48
7. Zusammenfassung	54
8. Literaturverzeichnis	56
9. Lebenslauf	65

Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
ATP	Adenosintriphosphat
COMT	Catechol-O-methyltransferase
DA	Dopamin
DBH	Dopamin- β -hydroxylase
DHPG	Dihydroxyphenylglykol
KA	Katecholamine
MAO	Monoaminoxidase
MHPG	Methoxy-hydroxyphenylglykol
NA	Noradrenalin
PNMT	Phenyläthylamin-N-methyltransferase
PSA	Propionsäureanhydrid
p.m.	Post mortem
VMS	Vanilinmandelsäure
RS	Reinsubstanzen

1. Einleitung

1.1. Absicherung der Diagnose der eigentlichen Todesursache durch physiologisch-chemische Befunde

Die Feststellung der letzten Todesursache ist allein aufgrund des histologischen und pathologisch-anatomischen Befundes oft nicht möglich. In der Gerichtsmedizin ergibt sich häufig die Notwendigkeit, die Sektionsdiagnose noch durch physiologisch-chemische Befunde zu sichern. Abgesehen von den toxikologischen sowie histologischen Untersuchungen liegen auf diesem Gebiet bis heute wenige Erfahrungen vor.

Aufgrund der Kenntnis der Physiologie des Kreislaufs kann vermutet werden, daß nicht nur im Rahmen der physiologischen Anpassung, sondern auch bei den schnell tödlichen Funktionsstörungen des Kreislaufsystems stark ausgeprägte Reaktionen stattfinden. Den Beweis dafür erbrachte BERG, 1963 (4), indem er die prä mortal oder agonal freigesetzten Katecholamine (KA) post mortem im Leichenblut bestimmte. Aus der Streßforschung ist ferner bekannt, daß die physiologischen Reaktionen durch den zeitlichen Ablauf der Funktionsstörung beeinflußt wird. Den möglichen Todesarten lassen sich verschiedene Agonieformen zuordnen, deren wichtigstes Unterscheidungsmerkmal die Zeitdauer ist. BERG definierte die Agonie als einen sehr labilen Gleichgewichtszustand zwischen Leben und Tod, der sowohl zur Genesung, als auch zum Tode führen kann. Während der Agonie kommt es zu einer lebensbedrohlichen Herabsetzung der wichtigsten Funktionen des Organismus (Kreislauf, Atmung, ZNS). Kommt es zum Stillstand der Atmung und des Kreislaufs und ist eine Wiederbelebung dieser wichtigsten Funktionen für den Organismus nicht mehr möglich, spricht man vom Tod.

LAVES, 1963 (38) unterscheidet 4 Typen von Agonien:

Typ 1: keine Agonie - aus zeitlichen Gründen kann es hier zu keiner Agonie kommen, da der Tod plötzlich eintritt.
z.B. Flugzeugabstürze, Gasexplosionen

Typ 2: sehr kurze Agonie - sie liegt im Bereich weniger Min.
z.B. Erhängen, Ersticken, Herzinfarkt

Typ 3: lange Agonie - protrahierte Agonie, in Fällen von chronischen Erkrankungen.

Typ 4: verlängerte Agonie - wird vor allem bei Krankenhauspatienten beobachtet. Es handelt sich um eine durch Wiederbelebungsmaßnahmen verlängerte Agonie.

Es wird vermutet, daß die postmortal durchgeführte quantitative Bestimmung von Katecholaminen im Blut die Möglichkeit zur Differenzierung von Todesursachen bietet. Da die experimentelle Methodik - insbesondere das Aufbereitungsverfahren für postmortale Blutproben - noch nicht in allen Einzelheiten entwickelt ist, liegt bisher nicht genügend Erfahrung für eine sichere Anwendung der Verfahren in der Praxis vor.

1.2. KA-Freisetzung aufgrund von Stress in lebensbedrohenden Situationen

Durch postmortale Bestimmung von KA wird der Nachweis dafür gesucht, daß in Situationen, die auf dem Weg der physiologischen Anpassung nicht mehr beherrschbar sind, es je nach Dauer der Stresseinwirkung, bzw. der Länge der Agonie zu unterschied-

licher KA-Freisetzung kommt.

Der Begriff "Stress" beschreibt im engen Sinn die physiologischen Reaktionen des Organismus auf belastende Einwirkungen auf den Organismus bzw. die Psyche eines Menschen. In einer weiter gefaßten Definition des Begriffes werden die Ursachen oder Auslöser der physiologischen Reaktionen als Stress bezeichnet.

Im allgemeinen versetzen die Stressreaktionen den Organismus in die Lage, kritische Situationen zu überstehen. Übersteigter Stress kann aber durch eine Rückkopplung zu schädlichen Überreaktionen führen. So kann z.B. eine durch myokardiale Nekrose verursachte Verminderung des Sauerstoffangebotes oder eine Störung der Sauerstoffabgabe und -verwertung einen Schock hervorrufen. In der Regel ist der Schock von einer starken sympatho-adrenalen Stimulation begleitet. Die dadurch bewirkte Katecholaminfreisetzung dient ansich der initialen Überbrückung der akuten Lebensgefahr, eine länger andauernde Freisetzung verschlimmert aber den Schockzustand unter Umständen bis hin zur Agonie. Untersuchungen beim Hund haben gezeigt, daß die Katecholaminfreisetzung im hämorrhagischen Schock die Überlebenszeit verkürzt, SIEGENTHALER, 1973 (63). Rund 15% aller Herzinfarkte werden durch einen Schockzustand kompliziert, wobei die Mortalität mehr als 80% beträgt, SIEGENTHALER, 1973 (63). WORTSMAN, 1984 (65) findet bei Menschen unter chronischem Stress niedrigere Adrenalin- und Noradrenalinwerte (A: $0,14 \pm 0,06$ ng/ml, NA: $0,52 \pm 0,06$ ng/ml) als unter maximalem Stress, verursacht durch Herzstillstand mit nachfolgender Wiederbelebung (A: $10,3 \pm 2,9$ ng/ml, NA: $7,37 \pm 1,8$ ng/ml). Bei normalen Personen liegen die Werte bei $0,034 \pm 0,002$ ng/ml für Adrenalin und $0,028 \pm 0,01$ ng/ml für Noradrenalin. WORTSMAN, 1984 (65) hat ferner den Effekt einer Adrenalin-Therapie auf den Plasma-Adrenalin-Wert untersucht. Bei drei Überlebenden, von 13 Personen, die Adrenalin während der

Wiederbelebnungsmaßnahmen erhalten haben, werden die extrem hohen Werte 3,89, 22,7 und 273 ng/ml gefunden. Die Gabe von Adrenalin steigert auch die Plasma-Konzentration von Noradrenalin. Der Autor weist darauf hin, daß das Überleben von sehr hohen Plasma-KA-Konzentrationen wahrscheinlich nur unter der strengen medizinischen Überwachung einer Intensivstation möglich ist.

Wegen der Aufgabenstellung, KA-Werte im Leichenblut von an Herzversagen Gestorbenen oder Erhängten zu bestimmen, sind hier die Asphyxie und die Hypoxie als Ursachen von Stress von besonderem Interesse.

Asphyxie: Erstickungszustand als Folge des Absinkens des O_2 -Spiegels und der Anreicherung von CO_2 im Blut.

Hypoxie: Mangel an Sauerstoff im Gewebe z.B. durch Herzinfarkt.

Die Verminderung des Sauerstoffangebotes bzw. der CO_2 -Überschuß bewirkt eine massive Sympathikusaktivierung, die wie im Bild 1 skizziert u.a. zu einer erhöhten KA-Freisetzung führt. Die anderen im Bild 1 aufgezeigten Wirkungen von Stress werden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

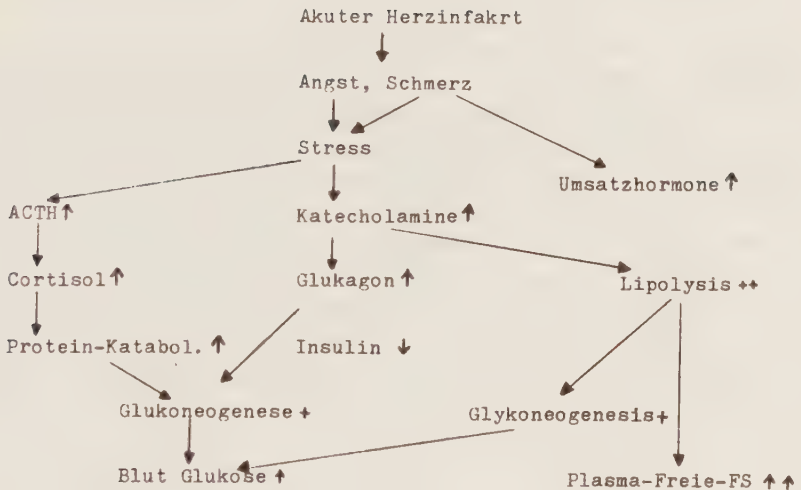


Bild 1: Physiologische Reaktionen bei Stresseinwirkung dargestellt am Beispiel eines Herzinfarktes.
YLIKAHRI, 1979 (65).
+ erhöhter Umsatz, ++ stärker erhöhter Umsatz,
↑ erhöhter Substanzspiegel, ↑↑ stärker erhöhter Substanzspiegel, ↓ erniedrigter Substanzspiegel.

2. Biogene Amine

2.1. Mechanismus der KA-Freisetzung

Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin werden als Katecholamine bezeichnet. Adrenalin wird im Nebennierenmark¹⁾ und Noradrenalin im Nebennierenmark und in den sympathischen Nervenendigungen synthetisiert und gespeichert. Entwicklungsgeschichtlich sind sowohl das Nebennierenmark als auch die sympathischen Nervenendigungen auf ein sympathisches Ganglion zurückzuführen. Die Synthese der Katecholamine ist an beiden Orten identisch. Die Nervenendigungen besitzen die Besonderheit, daß ein Teil des dort gebildeten Noradrenalins sezerniert wird und dann wieder in die adrenergen Neurone aufgenommen wird. Dafür verantwortlich ist ein aktiver Wiederaufnahmemechanismus. Etwa 1/3 des Gesamt-NA im Plasma stammt nach tierexperimentellen Untersuchungen aus dem NNM, KVETNANSKY, 1973 (37). Bei beidseitiger Adrenalectomie sinkt der Adrenalin-Spiegel im Plasma annähernd auf Null ab, während der Noradrenalinspiegel sich kaum ändert, KVETNANSKY, 1977 (36). Die Sekretion der Katecholamine wird ausgelöst durch eine Verminderung des O₂-Angebotes und durch CO₂-Anreicherung. Die Ursachen dafür können sein: z.B. Myocardinfarkt, akuter Blutverlust, Erstickung. Durch den CO₂-Überschuß wird das Vasomotorenzentrum direkt erregt und Noradrenalin an den sympathischen Nervenendigungen freigesetzt. Unmittelbar danach erscheint es auch im Blut. Durch das Absinken des arteriellen Sauerstoffdruckes werden die Chemo- und Pressorrezeptoren erregt. Dies führt über die Stimulation des Sympathicus zur Erhöhung der Katechol-

1) Es ist nachgewiesen, daß Adrenalin auch außerhalb des Nebennierenmarks gebildet wird (Gehirn, Herzmuskel). BERTEL, 1978 (7) zeigt experimentell, daß bei einem Herzinfarkt das im Plasma befindliche Adrenalin zum Teil aus der myocardialen Freisetzung stammt.

aminsynthese und -ausschüttung aus dem Nebennierenmark. Die erhöhte Katecholaminsynthese und -freisetzung wird noch verstärkt, da ein erhöhter Adrenalin Spiegel beim Menschen Angstgefühle erzeugt, BERTEL, 1978 (7).

2.2. Synthese der Katecholamine

Der Biosyntheseweg der Katecholamine wurde von UDENFRIED, 1966 (59) und seinen Mitarbeitern bewiesen. Wir stützen uns hier auf das Schema und die Ausführungen von KAUERT, 1977 (30). Wie aus dem Bild 2 ersichtlich ist, läuft die Biosynthese hauptsächlich über die Stufen Phenylalanin, Tyrosin und Dopamin. Als Katalysatoren dienen die Enzyme Phenylalahydroxylase, Tyrosinhydroxylase, Decarboxylase, Dopamin- β -hydroxylase. KAUERT zeigt einen Nebenweg auf, durch mittelstarke Pfeile gekennzeichnet, der ebenso denkbar ist. Ein 3. hypothetischer Syntheseweg, Kennzeichnung mit der Zifferfolge 3-8-7-4-5, ist die Synthese von Dopamin aus Tyrosin mit der Zwischenstufe Tyramin.

Der erste Schritt auf dem Hauptweg der Synthese, vom Phenylalanin zum Tyrosin, findet in der Leber statt. Das hier entstandene Tyrosin wird durch einen speziellen Transportmechanismus von der Blutbahn in die adrenergen Nervenendigungen gebracht. Im Cytoplasma der Neurone befinden sich die Tyrosinhydroxylase und die Decarboxylase, die das Tyrosin in Dopamin umwandeln. Dopamin tritt in die granulierten Vesicel ein und wird zu Noradrenalin umgewandelt. Der die Syntheserate limitierende Schritt ist die Umwandlung von Tyrosin in Dopamin, FÜRSTER, 1975 (18). Der Syntheseweg im Nebennierenmark ist ähnlich, doch tritt hier zusätzlich ein cytoplasmatisches Enzym auf, die Phenyläthanolamin-N-Methyltransferase (PNMT).

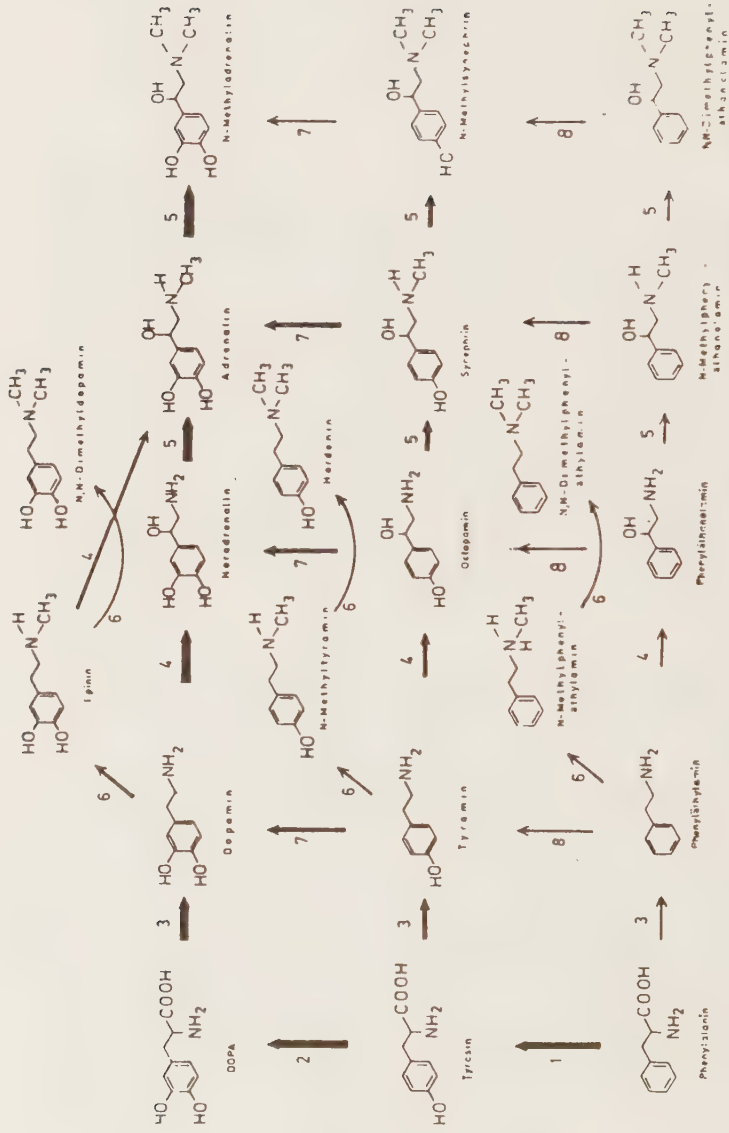


Bild 2 : Biosynthese der Katecholamine. 1 = Phenylaldehydoxylase; 2 = Tyrosinhydroxylase; 3 = Decarboxylase; 4 = Dopamin- β -hydroxylase; 5 = Phenyläthanol-N-methyltransferase; 6 = unspezif. N-Methyltransferase; 7 = Katecholbildendes Enzym; 8 = para-Hydroxylase, aus KAUERT, 1977 (30)

Dieses Enzym fördert die Umwandlung von Noradrenalin in Adrenalin. Es wird nur im Nebennierenmark in sehr hohen Konzentrationen gefunden, so daß einsichtig ist, daß nur hier Adrenalin in bedeutenden Mengen produziert wird.

2.3. Metabolismus der Katecholamine

Der Abbau der Katecholamine wird in Bild 3 dargestellt, KAUERT, 1977 (30). Die Halbwertszeit im Blut wird durch die Konzentration der metabolisierenden Enzyme und der Cofaktoren O_2 und ATP bestimmt. Die entscheidenden Schritte beim Abbau der Katecholamine sind die Methylierung und die oxidative Desaminierung mit Hilfe der Katecholamin-O-Methyltransferase (COMT) bzw. der Monoaminoxidase (MAO). COMT liegt in Leber und Niere in hohen Konzentrationen vor, es fehlt in den adrenergen Nervenendigungen. MAO wird besonders reichlich in den Mitochondrien, besonders von Gehirn, Leber und Nieren, gefunden. Außerdem liegt es in hohen Konzentrationen in den adrenergen Nervenendigungen vor.

Es gibt zwei verschiedene Abbaumechanismen: den Abbau der zirkulierenden Katecholamine, vorwiegend in der Leber, und den Abbau von Noradrenalin in den adrenergen Nervenendigungen. Zirkulierendes Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin werden zum Großteil O-methyliert. Etwa 2/3 der Abbauprodukte Normetanephrin, Metanephrin und Methoxytyramin wird im Harn ausgeschieden, der Rest der beiden ersten Derivate wird größtenteils durch MAO oxidiert zu Methoxy-Hydroxyphenylglykol (MPHG) und weiter oxidiert zu Vanilinsäurealdehyd und Vanilinmandelsäure (VMS) die im Harn ausgeschieden wird. Die Abbauprodukte von Methoxy-Tyramin sind hier nicht weiter von Interesse. In den adrenergen Nervenendigungen wird Noradrenalin durch MAO zu 3,4 Dihydroxy-Mandelsäurealdehyd desaminiert und zu

3,4-Dihydroxy-Mandelsäure weiteroxidiert bzw. zu 3,4-Dihydroxyphenylglykol (DHPG) reduziert. Diese Verbindungen gelangen in die Blutzirkulation und werden durch COMT zu Vanilimandelsäure bzw. MHPG methyliert und im Harn ausgeschieden.

Beim Menschen ist VMS der mengenmäßig dominierende Katecholamin-Metabolit im Harn. Die Messungen der Konzentrationen von Normetanephrin und Metanephrin im Harn ist eine Methode zur Bestimmung der Sekretionsrate von Adrenalin und Noradrenalin.

2.4. Konzentrationsänderungen während Stress

Alle Konzentrationsänderungen der biogenen Amine nach Stress beruhen auf neuronalen und humoralen Aktivitätsänderungen, wie durch biochemische Untersuchungen von KORF, 1973 (34) und CHU, 1973 (12), sowie durch pharmakologische Untersuchungen von MAYNERT, 1964 (45), LINDBRINK, 1972 (39).

Nach ausgeprägten Stresszuständen kommt es durch die Adrenalin-Ausschüttung zur Minderung des Adrenalingehaltes im Nebennierenmark, gleichzeitig steigt der Adrenalingehalt im Blut, SULTANOV, 1976 (58), KVETNANSKY, 1973 (35), AVAKIAN, 1976 (1). Als Folge der Blutkonzentrationserhöhung steigt sie auch in Leber, Niere, Herz und Gehirn, MATLINA, 1976 (44). Ähnlich verhält es sich mit Noradrenalin, es kommt zur Entleerung der Speicher der symp. Nervenendigungen.

Auf der Basis seiner Beobachtungen der Änderung in der Katecholaminkonzentration unter verschiedenen Stresssituationen schlug MATLINA, 1976 (44) drei Hauptphasen der Änderung der sympathischen Adrenalin-Aktivität vor. Die Dauer jeder Phase wird durch die Art und Stärke des Effekts bestimmt.

1. Phase: Nach dem Auftreten des Stressors kommt es zur schnellen Aktivierung. Charakteristisch ist eine Freisetzung von NA aus dem Hypothalamus und anderen Teilen des ZNS. Dies führt zur Aktivierung des adrenergischen Systems und zur Sekretion von Adrenalin ins Blut, ohne Verringerung des Adrenalin-gehaltes im Nebennierenmark. Dadurch steigt der Adrenalin Spiegel im Herzen, was zu einer signifikanten Erhöhung des Schlagvolumens führt.
2. Phase: Charakterisiert durch weitere Sekretion von Adrenalin ins Blut und einer Erhöhung des Adrenalin-gehaltes in der Leber. Ein Übertritt von Adrenalin über die Blut-Gehirn-Schranke in den Hypothalamus und andere Gehirnbereiche ist möglich.
3. Phase: Es kommt zur Reduktion der sympathischen Aktivität hauptsächlich in den peripheren Teilen des Systems. Die Konzentration von Adrenalin im Nebennierenmark fällt stark ab, die Adrenalinsekretion ins Blut ist herabgesetzt. Der Inhalt an Katecholaminvorläufern ist in allen Geweben verringert.

In gerichtsmedizinischen Untersuchungen sind Änderungen in den Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin während der Stressphase ein wichtiger Indikator für die Länge der Agonie. Zur Änderung des Adrenalin-gehaltes in den Organen (Herz, Leber, Milz, Nebennieren) liegen noch keine eindeutigen Ergebnisse vor. Von verschiedenen Autoren werden daher recht unterschiedliche Beurteilungen abgegeben. Im Blut dagegen wurde nachgewiesen, daß nach Stresssituationen sowohl für Noradrenalin, als auch für Adrenalin nach protrahierten Agoniezuständen die Konzentration steigt. So wies LUND, 1964(43), Adrenalinwerte im Blut von Leichen nach, deren Todeskampf

"einige Minuten" dauerte, die doppelt so hoch waren wie die, die nach einem sofortigen Tod gemessen wurden. BERG, 1966 (5), hat nach langandauernder Agonie Adrenalinwerte von 89,5 ng/ml gemessen. Normalwerte liegen bei 0,07 ng/ml. VENDSALU, 1960 (62) wies erhöhte Werte von Noradrenalin nach ausgeprägter Agonie nach. Im Vergleich zum Normalwert von 0,4 ng/ml hat er durchschnittlich 11 ng/ml gemessen. Bei ultrakurzen Agonien liegen die Konzentrationen etwa bei 2,7 ng/ml Adrenalin und 26,5 ng/ml Noradrenalin, BERG, 1966 (5). Trotz einer relativ großen Streuung der Meßwerte kann als gesichert gelten, daß eine Abhängigkeit der Werte im Blut von der Dauer der Streßsituation bzw. der Dauer der Agonie besteht.

Es muß gleichzeitig mitberücksichtigt werden, daß während der nervösen Stimulanz die Turnover-Rate der Neurotransmitter erhöht ist, ohne daß dabei deren Gesamtkonzentration betroffen sein muß.

2.5. Postmortale Veränderungen im Stoffwechsel der Katecholamine

Das postmortale Verhalten biogener Amine und ihrer synthetisierenden und metabolisierenden Enzyme ist ein wichtiger Faktor, der im Rahmen dieser Untersuchungen zu berücksichtigen ist.

Die Enzyme des Katecholaminstoffwechsels sind, z.T. in sehr unterschiedlichem Umfang auch nach dem Tod noch wirksam. Ihre Aktivität wird bestimmt, wie im folgenden ausgeführt durch die Menge der Co-Faktoren:

Synthetisierende Enzyme: Die Veröffentlichungen zu diesem Thema beschränken sich auf die Abläufe im Gehirn. Für die Tyrosinhydroxylase zeigt sich im allgemeinen ein Rückgang der Aktivität. MC GEER 1971 (46), hat nach vier Stunden einen um 50% verminderten Wert gemessen. Die Dopadecarboxylaseaktivi-

tät nimmt bei der Mehrzahl der Autoren postmortal etwa um 20% ab. Die Dopamin- β -Hydroxylase scheint einer etwas geringeren postmortalen Aktivitätsverringerung von 15-25% in den ersten Stunden zu unterliegen.

Metabolisierende Enzyme: Es stehen keine Veröffentlichungen über das postmortale Verhalten der Katecholamine im Serum oder in peripheren Organen zur Verfügung. Untersuchungen am Gehirn haben gezeigt, daß die Katecholamine postmortem enzymatisch abgebaut werden. Einige Autoren nehmen an, daß postmortal nur solche Metaboliten entstehen können, deren Bildung durch die COMT katalysiert wird. Das sind im wesentlichen 3-Methoxytyramin, Metanephrin und Normetanephrin. COMT bleibt noch lange nach dem Tode funktionsfähig, doch benötigt es für seine Aktivität S'Adenosylmethionin als Cofaktor, dessen Aktivität wiederum ATP-abhängig ist. Daher werden die Katecholamine nur so lange abgebaut, wie ATP aus den Speichern freigesetzt wird oder aus der anaeroben Glykolyse hervorgeht. Die Aktivität des zweiten metabolisierenden Enzyms MAO ist abhängig von der Gegenwart molekularen Sauerstoffs, dessen Gehalt nach dem Tode zwangsläufig fällt. Als Beweis dafür dient die durch MAO katalysierte Bildung der Dihydroxymandelsäure, die postmortal keine Zunahme zeigt. Deshalb ist dieser Abbauprozess postmortal zu vernachlässigen. Trotz ausreichendem Spiegel an MAO wird der postmortale Metabolismus von NA nach der ersten durch COMT katalysierten Stufe abgebrochen. Als Beweis dafür dient der postmortale Anstieg des Normetanephrins.

FAIMAN, 1973 (17) berücksichtigte in seinen Untersuchungen nicht nur die Aktivität, sondern auch die Konzentration der metabolisierenden Enzyme. Er spricht in seinem Modell von einem multiphasischen Abbau des Noradrenalin (Michaelis-Menten Kinetik), der mit zeitlich variierender Abbaurate abläuft und der von der Enzymkonzentration abhängig ist.

In der Michaelis-Menten Kinetik 0. Ordnung, unmittelbar postmortem, wird NA mit konstanter Rate abgebaut, da das Enzymsystem gesättigt ist. In der darauffolgenden Phase nimmt die Enzymkonzentration ab und die Reaktionsrate verläuft ihr proportional, d.h. die Kinetik 1. Ordnung tritt an die Stelle der Kinetik 0. Ordnung. Die anfänglich höhere Umsatzrate an Noradrenalin verlangsamt sich bis hin zur Stagnation, wenn das Enzymsystem erschöpft ist.

In einem anderen Modell wird die zeitlich variierende Abbaurate dadurch erklärt, daß NA durch Exozytose aus den Speichervesikeln freigesetzt wird bis diese entleert sind. Auch damit wäre der zunächst lineare und dann exponentielle Abfall in der NA-Konzentration zu erklären.

3. Problemstellung

Von den bisher für Nachweis und Trennung biogener Amine eingesetzten chromatographischen Verfahren zeichnet sich die Gaschromatographie durch ein hohes Trennvermögen und die Anwendbarkeit zum Nachweis geringer Mengen aus.

Die Anwendung der Gaschromatographie setzt voraus, daß die zu analysierenden Substanzen als leicht verdampfbare Verbindungen in Lösung vorliegen. Die Problematik der Überführung der Katecholamine in gaschromatographierbare Substanzen wurde von KAUERT, 1977 (30), zunächst für Urinuntersuchungen gelöst. Danach konnte das Aufbereitungsverfahren so abgewandelt werden, daß auch Blutuntersuchungen damit durchgeführt werden können. In Vorversuchen wurde aber festgestellt, daß die gaschromatographische Fraktionierung von einer Störsubstanz verfälscht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das erprobte Aufbereitungs- und Trennverfahren zum Nachweis von biogenen Aminen aus Blut so modifiziert werden, daß Störsubstanzen aus der postmortalen biologischen Matrix, die die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme verfälschen können, vor der Auftrennung eliminiert werden. Da unbekannt ist, welche Substanz die Störung verursacht, wird ein Reinigungsverfahren gesucht, das nach Möglichkeit die Amine als Gesamtheit von den unerwünschten Substanzen abtrennt.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Materialien und Geräte

4.1.1. Materialien:

a) Standardsubstanzen:		Bezugsquelle
L-Epinephrin	Bitartrat	Sigma, München
L-Arterenol	HCL	" "
DL-Metanephrin	HCL	Sigma, München
DL-Normetanephrin	HCL	" "
3-Methoxytyramin	HCL	" "
Dopamin	HCL	Sigma, München
Tyramin	HCL	" "
Etilefrin	HCL	" "
b) Reagenzien:		
Propionsäureanhydrid purissimum		Fluka AG, Neu Ulm
Essigsäureanhydrid purissimum		" "
Essigsäureäthylenester (Äthylacetat)		Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat purissimum (NaHCO_3)		" "
c) Trennsäulenmaterial:		
3% OV-1 auf Chormosorb W	100/120 Mesh,	Macherey+Nagel Düren
3% Dexsil 400 auf Supelcoport	100/120 Mesh,	Supelco
5% OV-101 auf Chromosorb W	100/120 Mesh,	Macherey+Nagel Düren
Ultradond 20 M	100/120 Mesh,	Macherey+Nagel Düren

4.1.2. Geräte:

- Zentrifugengläser 100 ml mit Schraubverschluß und PTFE-Dichtung
- Reagenzgläser (12 ml und 5 ml Volumen) mit Teflon-schraubverschluß
- Pasteurpipetten
- Rotavapor "Büchi"
- Ultraschüttler "Heidolph"
- Beheizbarer Aluminiumblock mit Bohrungen für Reaktionsgläschen
- Gaschromatograph- "Hewlett Packard 5840 A" mit NFID
- Thin Chanell - Ultrafiltrationsgerät Amicon TCF 2A mit P Diaflo Membranen
- PH-Meter
- Gelchromatographische Säule
- Ionenaustauschersäule

4.1.3. Biologisches Material:

Die Blutproben (Herzblut) wurden von an Herzversagen und Erhängen Verstorbener anlässlich der Obduktion asserviert.

4.2. Gaschromatographischer Nachweis von Katecholaminen

Für den Nachweis und die Trennung biogener Amine ist ein chromatographisches Verfahren notwendig, das über große Empfindlichkeit und hohes Trennvermögen verfügt. Vorhergehende Untersuchungen von KAUERT, 1977 (30) haben die Vorteile der Gaschromatographie für die Analyse der Katecholamine und ihrer Metaboliten aufgezeigt. Dieses Verfahren bietet außerdem den Vorzug, daß die auftretenden Substanzen in einem Massenspektrometer eindeutig identifiziert werden können.

Um biogene Amine gaschromatographisch nachweisen zu können, müssen ihre polaren Gruppen so umgesetzt werden, daß sich Derivate bilden, die noch verdampfbar sind. Bei unseren Untersuchungen wird dies durch Propionylierung, d.h. durch Veresterung der phenolischen und alkoholischen OH- sowie der primären und sekundären Aminogruppen erreicht, KAUERT, 1977 (30).

In früheren Experimenten wurde vor der extraktiven Derivatisierung lediglich eine Ultrafiltration zur Trennung korpuskulärer Blutbestandteile und auch gelöster Stoffe, vom meistens hämolytischen postmortalen Serum vorgeschaltet. Es wurde bei der verwendeten Membran eine Abtrennung von Plasma-Proteinen bis zu einer Molekular-Gewichtsgrenze von 10.000 erreicht. Dabei hat sich herausgestellt, daß die Störsubstanzen und die zu analysierenden Amine in den gaschromatographischen Kurven mit sich überlappenden Peaks in Erscheinung treten. Daraus ergibt sich eine erhebliche Unsicherheit bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse, die nur durch Abtrennung der Störsubstanzen behoben werden kann. In dieser Arbeit werden die Gelchromatographie und die Ionenaustauschchromatographie auf ihre Eignung zur Abtrennung der Störsubstanzen unter besonderer Berücksichtigung postmortaler Verhältnisse untersucht. Im nachfolgenden werden die einzelnen Schritte des gesamten Trennverfahren beschrieben.

4.2.1. Die Ultrafiltration

Wenn die zu untersuchende Blutprobe tiefgefroren ist, wird sie in einem warmen Wasserbad langsam, in ca. 1 Std. aufgetaut. 10 ml Blut werden im Verhältnis 1:1 mit einer 10%igen Äthanollösung und 2 µg Etilefrin als internem Standard versetzt. Der Standard wird als wässrige Lösung (1,0 mg/ml Etilefrin-Base) zugesetzt, die durch 1N HCL auf einen pH-Wert von 3 gebracht wird und dadurch haltbar gemacht wird. Von der aufbereiteten Blutprobe wird im Ultrafiltriergerät 10 ml Ultrafiltrat durch Passage einer semipermeablen Membran mit einer Trenngrenze von Molgewicht 10 000 gewonnen.

4.2.2. Elimination von Störsubstanzen

Die ersten Versuche, in denen das Ultrafiltrat extraktiv derivatisiert, nachderivatisiert und dann gaschromatographisch aufgetrennt wurde, zeigten Peaks unbekannter Störsubstanzen die sich mit den Peaks der von uns gesuchten Substanzen überlagerten. Wie im Bild 7 zu sehen ist, ist davon besonders der Bereich des Methoxy-Tyramin betroffen. Solche Doppelpeaks verfälschen die Berechnung der Fläche der Peaks, aus der die Konzentration des jeweiligen Amins bestimmt wird. Es stellte sich damit die Aufgabe, ein Reinigungsverfahren zu finden, mit dem die Störsubstanzen aus dem Ultrafiltrat abgetrennt werden können, ohne den weiteren Aufbereitungsprozeß für die KA und deren Metaboliten zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Gelchromatographie und die Ionenaustauschchromatographie als Reinigungsverfahren erprobt werden.

4.2.2.1. Gelchromatographie

Für die Gelchromatographie sind auch die Bezeichnungen Gel-filtration, Molekularsiebchromatographie, Molekularfiltration oder Ausschlußchromatographie gebräuchlich. Die wesentlichen Merkmale des Verfahrens hat DETTERMANN, 1967 (15) in einer systematischen Untersuchung herausgestellt. Das Verfahren trennt Stoffgemische aufgrund von Unterschieden in der Molekülgröße. Während kleine Moleküle mit größerer Wahrscheinlichkeit in die Poren der Gelpartikel eindringen, diffundieren die großen Moleküle ungehindert durch die Säule und erscheinen deshalb früher im Eluat.

Das verbreitetste Material in der Gelchromatographie ist das Dextrangel Sephadex. Es wird in acht im Quellvermögen unterschiedlichen Typen hergestellt. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Unsere Versuche wurden mit Sephadex LH-20 (G-25 alkyliert) durchgeführt. Das pulverförmige Sephadex LH-20 mußte in H_2O , bzw. Äthylacetat 3 Std. bei Zimmertemperatur und anschließend 1 Std. im Wasserbad bei $100^{\circ}C$ quellen. Als Lösungsmittel diente Äthylacetat, das auch im übrigen Aufbereitungsprozeß der Ultrafiltrate verwendet wurde.

Der eigentliche Zweck der Gelchromatographie in unseren Untersuchungen bestand darin, die Gesamtheit der uns interessierenden Amine von den Störsubstanzen zu trennen. Aus diesem Grunde war es wichtig den genauen zeitlichen Ablauf der Elution der Amine an Reinsubstanzen in hoher Konzentration zu bestimmen. Wir sammelten das ganze Volumen fraktionsweise nach Minuten. Jede einzelne Fraktion, insgesamt 24, wurde extraktiv derivatisiert und nachderivatisiert. Die Derivate wurden in Äthylacetat aufgelöst und in den Gaschromatographen injiziert. Nach der Auswertung aller 24 Chromatogramme wurde

Typ	Korngröße trocken (μ)	H ₂ O-Aufnahme- vermögen (ml/g)	Gelbett- volumen (ml/g)	Ungefähr. Trennber. (M) Peptide und Dextran- glob. Proteine frakt.,	
G-10	40—120	$1,0 \pm 0,1$	2—3	bis 700	bis 700
G-15	40—120	$1,5 \pm 0,1$	2,5—3,5	bis 1 500	bis 1 500
G-25, coarse	100—300	$2,5 \pm 0,2$	4—6	1— 5 000	100— 5 000
G-25, medium	50—150				
G-25, fine	20—80				
G-50, coarse	100—300	$5,0 \pm 0,3$	9—11	1— 30 000	500— 10 000
G-50, medium	50—150				
G-50, fine	20—80				
G-75	40—120	$7,5 \pm 0,5$	12—15	3— 70 000	1— 50 000
G-100	40—120	$10,0 \pm 1,0$	15—20	4—150 000	1—100 000
G-150	40—120	$15,0 \pm 1,5$	20—30	5—400 000	1—150 000
G-200	40—120	$20,0 \pm 2,0$	30—40	5—800 000	1—200 000

Tabelle 2: Eigenschaften käuflicher Dextran-gele Sephadex
nach Angaben des Herstellers, aus DETTERMANN, 1967(15)

bestimmt, in welcher Zeit die Elution der Amine abgeschlossen war. In unserem Versuch war nach 16 min die Elution der Katecholamine und ihrer Metaboliten abgeschlossen. Bild 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Aminfraktionierung.

Um die Wirksamkeit der gelchromatographischen Trennung als Reinigungsverfahren in Bezug auf die Störsubstanzen zu erproben, wurde anschließend das Ultrafiltrat einer Blutprobe dem gleichen Verfahren unterworfen. Der zeitliche Verlauf der Auftrennung wurde in Bild 6 dargestellt. Man erkennt, daß die Störsubstanzen und Methoxy-Tyramin im Gelchromatographen gleichzeitig eluierten und in der hier beschriebenen Weise nicht getrennt werden konnten.

Eine weitergehende, möglicherweise zum Erfolg führende Bearbeitung der gelchromatographischen Vorreinigung konnte aus zeitlichen Gründen nicht stattfinden. An ihrer Stelle wurde die Ionenaustauschchromatographie auf ihre Eignung zur Lösung der vorliegenden Problemstellung untersucht.

4.2.2.2. Ionenaustauschchromatographie

Ionenaustauscher sind Stoffe, die von einer Elektrolytlösung Ionen aufnehmen und dafür im Austausch andere Ionen gleichen Vorzeichens abgeben. Zur Trennung von Aminosäuren haben sich Kunstharze in der Form von Kationenaustauschern bewährt. Wie in Bild 8 schematisiert dargestellt ist, wird die negative Überschußladung der Kunstharzmatrix durch positive Gegenionen kompensiert. Die Gegenionen können im Austausch durch Kationen aus der Elektrolytlösung ersetzt werden. Diese Eigenschaft kann zur Fraktionierung von Stoffgemischen, die als gelöste Elektrolyte vorliegen, genutzt werden, wenn zwischen den zu

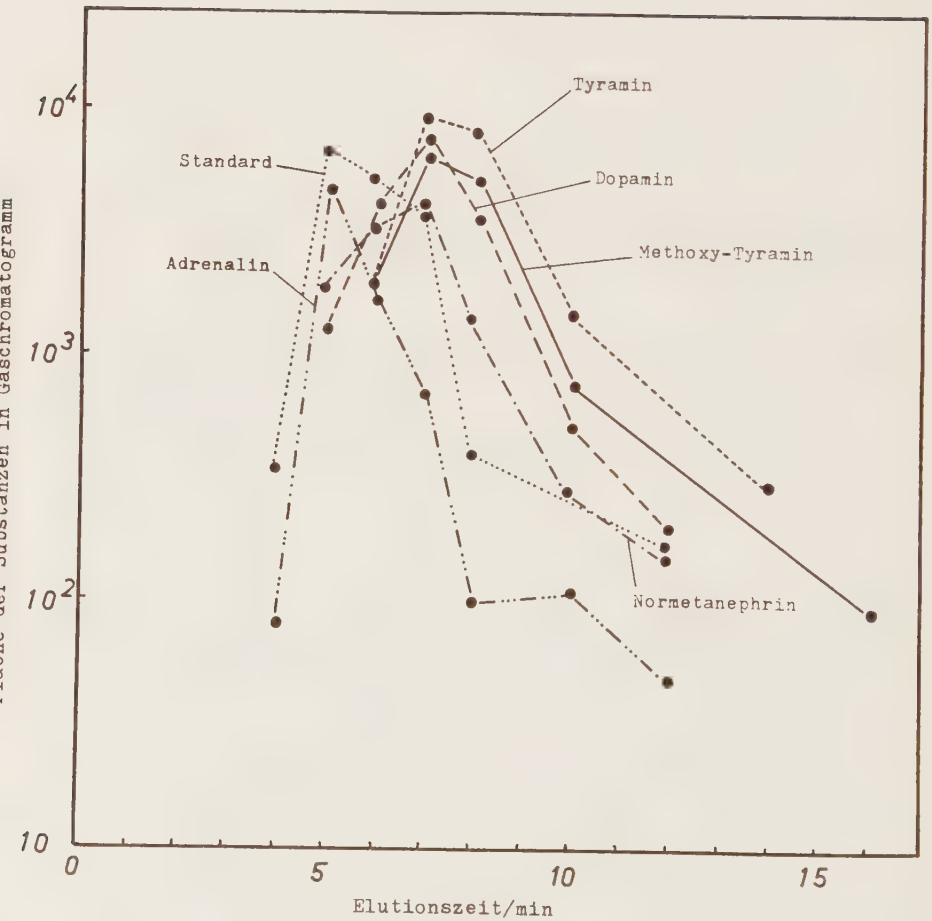


Bild 5: Bestimmung der maximalen Elutionszeit durch
gelchromatographische Trennung von RS der
biogenen Amine

Quotient: Fläche der Substanz/Fläche des Standards

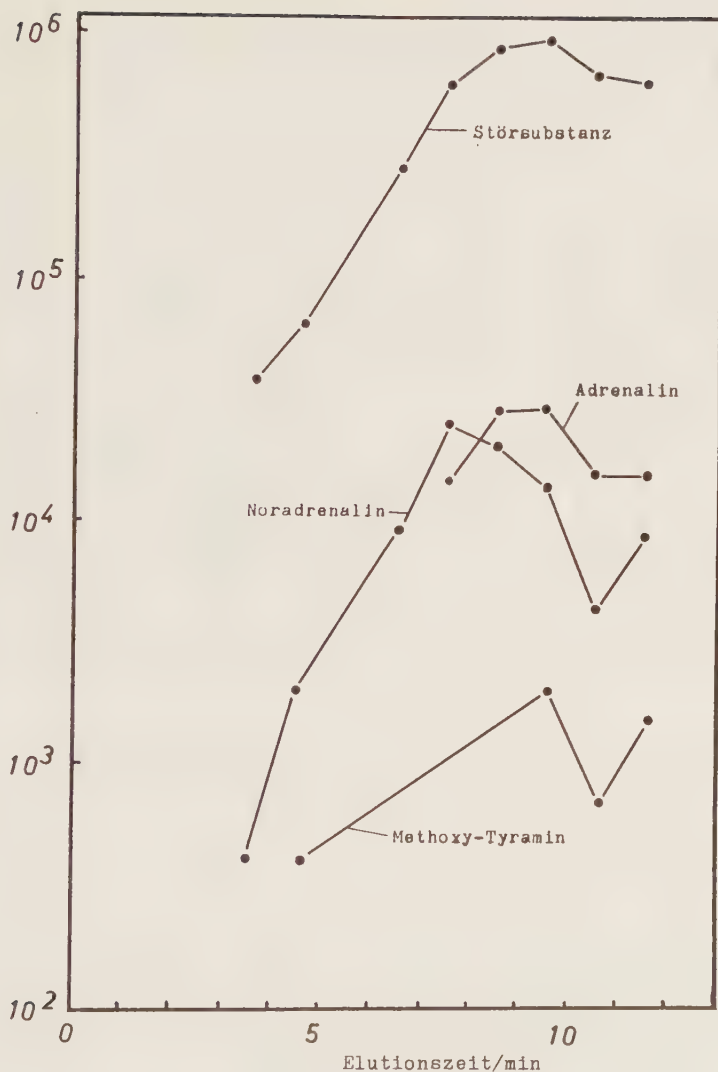
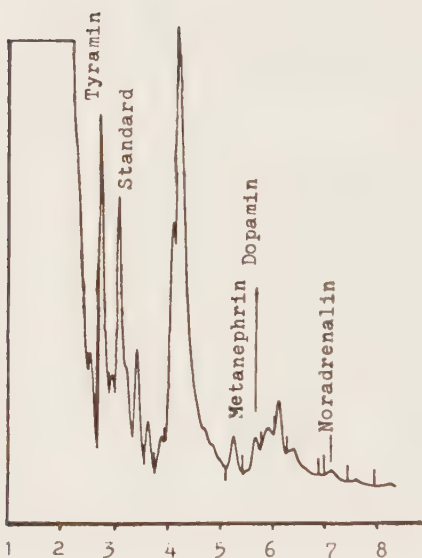
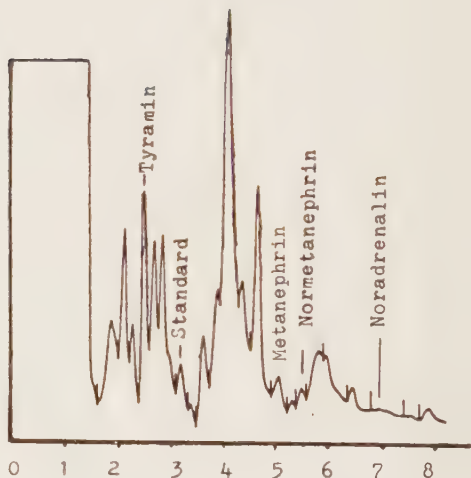


Bild 6: Zeitlicher Verlauf der Aminfraktionierung im Vergleich mit der Störsubstanz bei Anwendung der Gelchromatographie als Reinigungsverfahren Blutprobe 374/80



Retentionszeiten
(min)



Retentionszeiten
(min)

Bild 7: Gaschromatographischer Nachweis von Aminen und der unbekannten Störsubstanz (Ret.Zeit. 4,07 bzw. 4,08).

Bild links - Blutprobe mit Gelfiltration

Bild rechts - Blutprobe ohne Filtration

trennenden Substanzen Unterschiede in ihrer Affinität zur stationären Phase des Ionenaustauschers bestehen.



Bild 8: Struktur eines Kunstharz-Ionenaustauschers
(schematisch)

Austauscher auf Kunstharzbasis haben den Vorteil, daß ihre Eigenschaften weitgehend dem speziellen Verwendungszweck angepaßt werden können. Bei der Herstellung wird dazu auf Art und Zahl der Festionen und Aufbau und Vernetzung der Matrix Einfluß genommen.

Die Stärke der Bindung von Aminogruppen an das von uns eingesetzte Harz, Amberlite IRC 50 (schwach saurer Kationenaustauscher) wird beeinflußt vom pH-Wert der Lösung. Nach Untersuchungen von HIEMKE, 1977 (26), liegt der optimale pH-Wert für die Bindung der Amine zwischen 3 und 4. Zur Verdängung

der gebundenen Aminogruppen vom Ionenaustauscher kann der pH-Wert zum stärker Sauerem oder Alkalischen verschoben werden. Dies führt zu einer unerwünschten, starken Verdünnung im sauren Milieu bzw. zur Zerstörung von im basischen Milieu instabilen Substanzen wie Dopamin und Adrenalin. Um diese Probleme zu umgehen, wurde das von HIEMKE, 1977 (26), erprobte Verfahren angewandt. Die Amine wurden in der Bindung an das Austauscherharz durch Propionylierung derivatisiert. Die Aminogruppen wurden dabei in Säureamidgruppen übergeführt, die nicht positiv geladen waren und deshalb vom Kationenaustauscher nicht mehr gebunden wurden.

Im folgenden wird die Abtrennung der unerwünschten Nebensubstanzen im Ionenaustauschverfahren beschrieben. Als Austauscherharz wurde Amberlite IRC-50 verwendet. Die Aufbereitung des Harzes umfaßt folgende Schritte:

1 Teil Harz (200-300 ml) wurde:

1. 5x mit je 3 Teilen Aqua dest. 10 min durchmischt
2. 3x mit je 1,5 Teilen 4N NaOH 30 min durchmischt
3. 2x mit je 1 Teil Äthylacetat 10 min durchmischt
4. 3x mit je 1,5 Teilen 2N HCL 30 min durchmischt
5. 3x mit je 1,5 Teilen 4N NaOH 30 min durchmischt

Nach jedem Arbeitsgang 3x mit je 3 Teilen Aqua dest. 10 min lang unter Rühren waschen (ab 2.)

6. mit Eisessig auf pH 6,1 eingestellt

Nach dem 4. Schritt wurde die Aufbereitung unterbrochen, ohne daß Einbußen in der Austauscherkapazität eintraten. Die Schritte 5 und 6 wurden unmittelbar vor Gebrauch durchgeführt. Verbrauchtes Harz wurde mehrfach regeneriert.

10 ml des fertig vorbereiteten Austauschers wurden in eine vom Glasbläser eigens dafür angefertigte Säule gefüllt.

Ein am unteren Ende der Säule angebrachter Glashahn regulierte die Durchlaufgeschwindigkeit des Eluates. In die Säule eingebrachte Glaswatte verhinderte das Auslaufen des Autauscherharzes. Dem oberen Ende der Glassäule saß ein Vorratsbehälter auf.

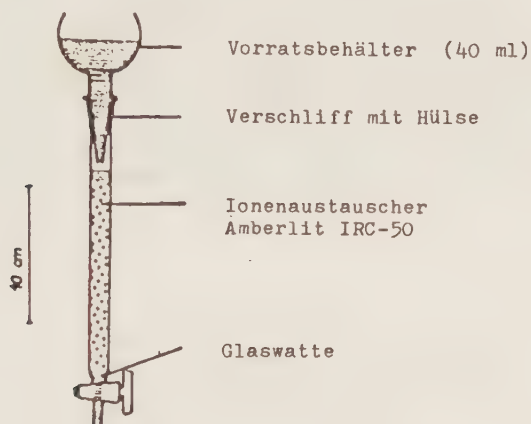


Bild 9: Ionenaustauschersäule
HIEMKE, 1977 (26)

Etwa 10 ml Ultrafiltrat wurde durch tropfenweise Zugabe von 1N HCL unter konstantem Rühren auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt und dann auf die vorbereitete Säule gegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde auf 1ml/min eingestellt. Nach Durchlaufen des Eluates wurde die Säule gründlich mit 20 ml Aque dest., mit 10 ml Äthanol/Aqua dest. (20%ig) und noch einmal mit 20 ml Aqua dest. gewaschen. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde hierbei auf 3-4 ml/min erhöht. Durch

die Verwendung von Äthanol wurden die adsorbtiv gebundenen Substanzen vom Harz nur herabgewaschen.

Zur Elution und gleichzeitigen Derivatisierung der Amine wurde das Ionenaustauscherharz in ein Zentrifugenglas gegeben. Wir haben hierzu das von HIEMKE, 1977 (26) angegebene Verfahren angewendet, um das Harz mit möglichst wenig Flüssigkeit herauszuspülen. Der Regulierhahn wurde verschlossen, der Vorratsbehälter abgenommen und die Glassäule aus ihrer Halterung genommen. Eine mit 5 ml Aqua dest. und 20 ml Luft gefüllte Injektionsspritze wurde auf den Säulenauslauf gesteckt. Das Harz wurde somit in ein Zentrifugenglas gepumpt.

4.2.3. Derivatisierung

Substanzen, die gaschromatographisch fraktioniert werden sollen, müssen ohne Umwandlung ihrer chemischen Struktur verdampfbar sein. Es ist notwendig, funktionelle Gruppen wie die phenolische und alkoholische Hydroxylgruppe, primäre und sekundäre Aminogruppen in ihrer Polarität herabzusetzen bzw. zu stabilisieren, um eine eventuell mögliche chemische Reaktion zwischen der Substanz (Amine) und der stationären Phase der gaschromatographischen Säule zu vermeiden. Geeignete Verfahren werden von KAUERT, 1979 (31) beschrieben.

Das Austauscherharz wurde mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) gesättigt und damit auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt. Nach Zugabe von 500 μl PSA und 10 ml Äthylacetat und 10 minütigem Schütteln wurde extraktiv derivatisiert (insgesamt 3x). Die obere, organische Phase, die die propionylierten Amine und Äthylacetat enthält, wurde abgehoben und in ein Reaktionsgläschen mit verschraubbarem Teflonverschluß übertragen. Anschließend wurden die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer unter einem Luftstrom von 25–30° C eingedampft.

Um eine vollständige Umsetzung der polaren Gruppen zu erreichen wurde nachderivatisiert.

4.2.4. Nachderivatisierung

Der Rückstand im Reaktionsgläschen wurde in 200 µl PSA und 50 µl Pyridin gelöst. Das durch Teflonverschluß abgedichtete Reaktionsgläschen wurde im Alu-Block 15 min lang auf 100°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde danach wiederum abgedampft. Zum Schluß wurde der Rückstand bei der Blutanalyse in 100 µl bzw. bei der Erstellung der Eichkurve in 1 ml Äthylacetat gelöst.

5. Auswertung

Im Gaschromatogramm erscheinen alle Substanzen als Peaks, die quantitativ über ihre Höhe oder ihre Fläche ausgewertet werden. Bei jedem Versuch wird annähernd 1 µl Probe in den Gaschromatographen injiziert. Jeder Probe wird, wie in 4.2.1. beschrieben, der interne Standard Etilefrin zugesetzt. Bei der quantitativen Auswertung des Gaschromatogramms werden die Quotienten aus den Flächen (bzw. Höhen) der Aminpeaks und dem Standardpeak bestimmt, um den störenden Einfluß von Variationen in der Injektionsmenge und der Empfindlichkeit des Chromatographen zu eliminieren. Als interner Standard wird Etilefrin verwendet, da diese Substanz in biologischen Proben nicht vorkommt und von den uns interessierenden Aminen sowie von den auftretenden Störpeaks gut chromatographisch getrennt werden kann.

Es ist unvermeidlich, daß trotz des Bemühens, den Aufbereitungsprozeß jedesmal in allen Details identisch durchzuführen, unterschiedliche Aminmengen in den Gaschromatographen injiziert werden. Um trotzdem Rückschlüsse auf die Absolutwerte der Konzentrationen in der unbehandelten Blutprobe ziehen zu können, wird das Aufbereitungsverfahren mit Reinsubstanzen der Amine, ebenfalls unter Zugabe des internen Standards geeicht.

5.1. Ermittlung der Eichkurven.

Um die Eichkurven zu ermitteln, werden 10%ige Lösungen der Reinsubstanzen in Pulverform in Aqua dest. hergestellt. Die Konzentration der Reinsubstanzen in der Lösung beträgt dann jeweils 1 mg/10 ml. Die Eichung wird mit Eichproben durchgeführt, die

die 0,5, 1, 2, 4 und 10 μg der Reinsubstanzen enthalten. Jeder Probe wird 2 μg interner Standard zugesetzt. Diese Eichproben werden in der gleichen Weise aufbereitet wie alle Blutproben. Aufbereitung und chromatographische Trennung werden zur Kontrolle zweifach durchgeführt. Die Chromatogramme werden automatisch vom Chromatographen nach den Flächen und von Hand nach den Höhen der Peaks ausgewertet. Um die Messungen vergleichen zu können, werden die Flächen- und Höhenwerte auf die entsprechenden Werte für den internen Standard bezogen. Die gemessenen Flächen- und Höhenquotienten werden als Funktion der Menge der Reinsubstanzen nach der Methode der kleinsten Quadrate, BRONSTEIN, 1967 (10), durch Geraden, approximiert die durch den Nullpunkt gehen. Deren Steigung wird dazu benutzt, aus den Flächen- bzw. Höhenquotienten der Chromatogramme die in den Blutproben nachweisbaren Aminkonzentrationen zu berechnen.

Die Bilder 10 bis 16 geben die Eichgeraden für die sieben Amine wieder.

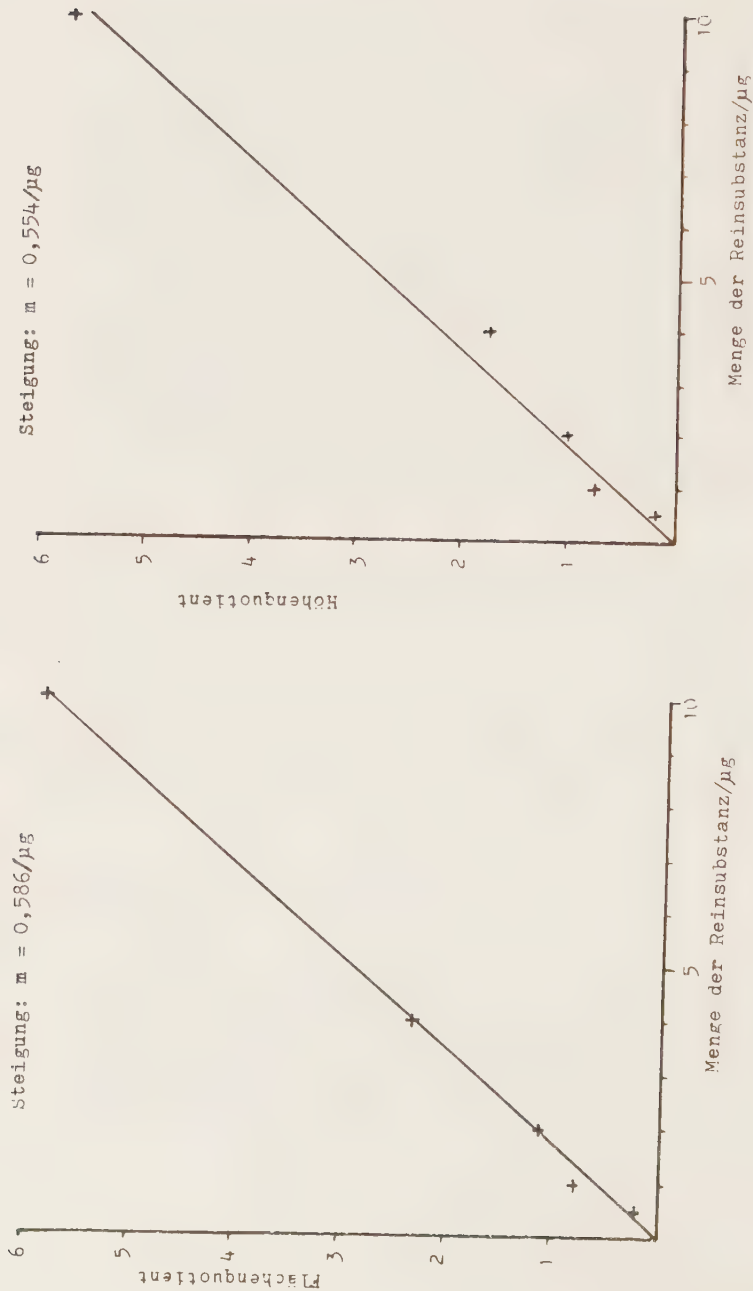
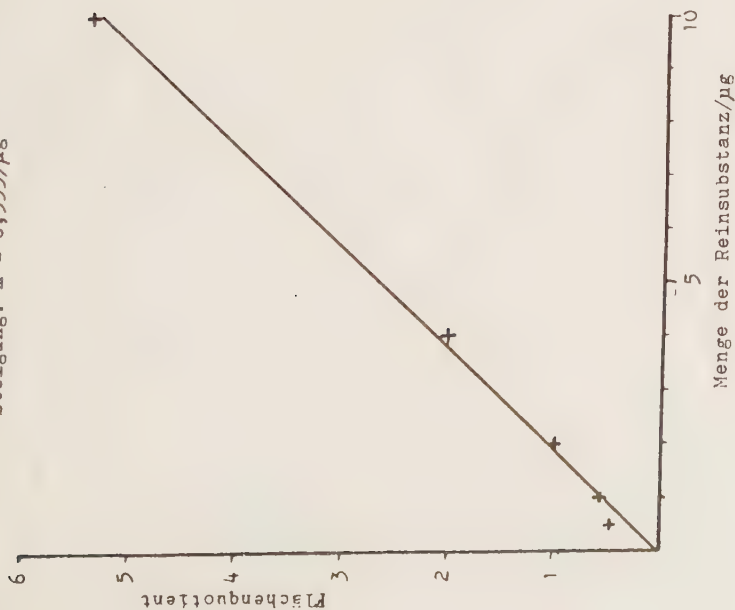


Bild 10: Eichgeraden für Tyramin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz.

Steigung: $m = 0,533/\mu\text{g}$



Steigung: $m = 0,447/\mu\text{g}$

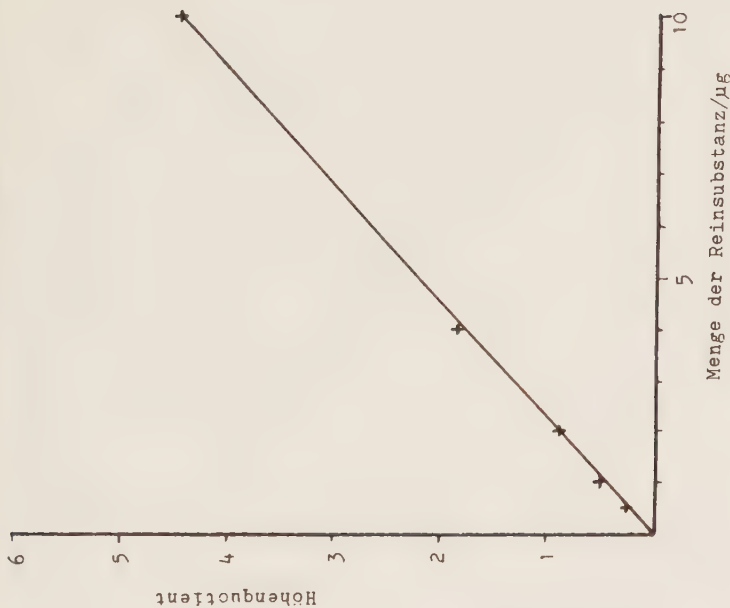
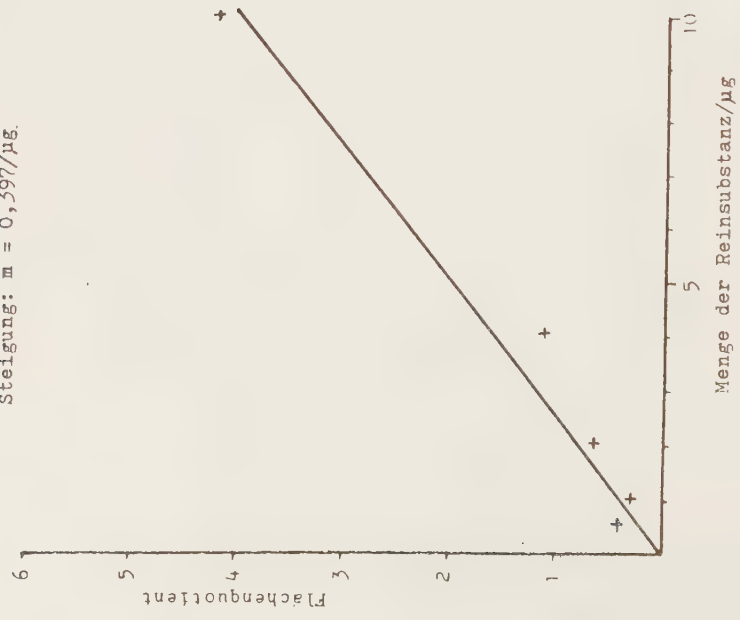


Bild 11: Eichgeraden für Methoxy-Tyramin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz.

Steigung: $m = 0,397/\mu\text{g}$.



Steigung: $m = 0,305/\mu\text{g}$

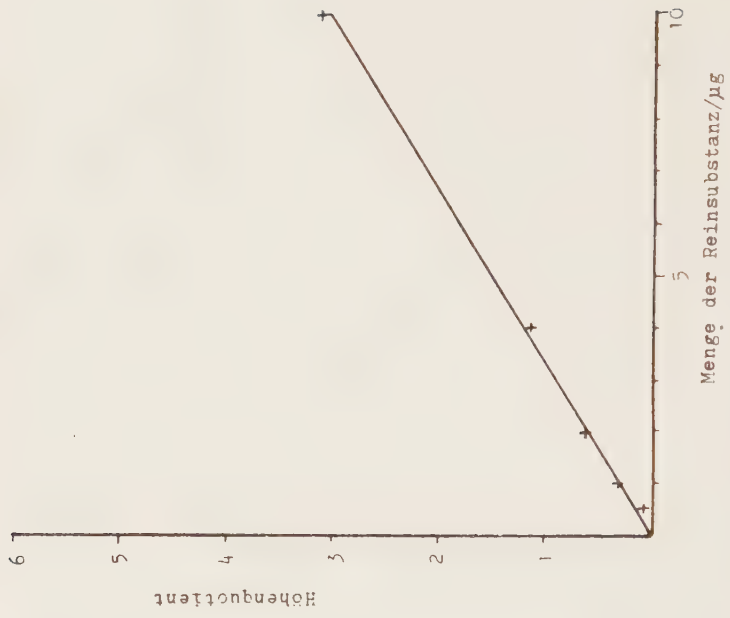
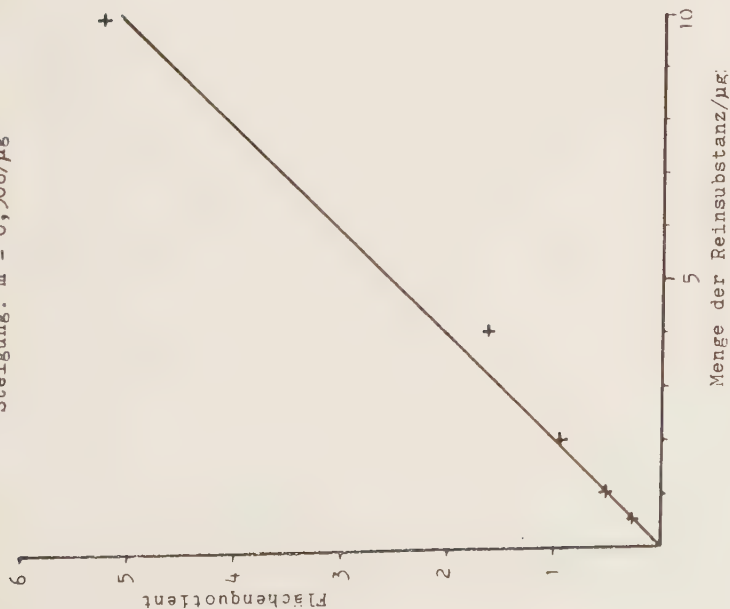


Bild 12: Eichgeraden für Metanephrin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz.

Steigung: $m = 0,508/\mu\text{g}$



Steigung: $m = 0,431/\mu\text{g}$

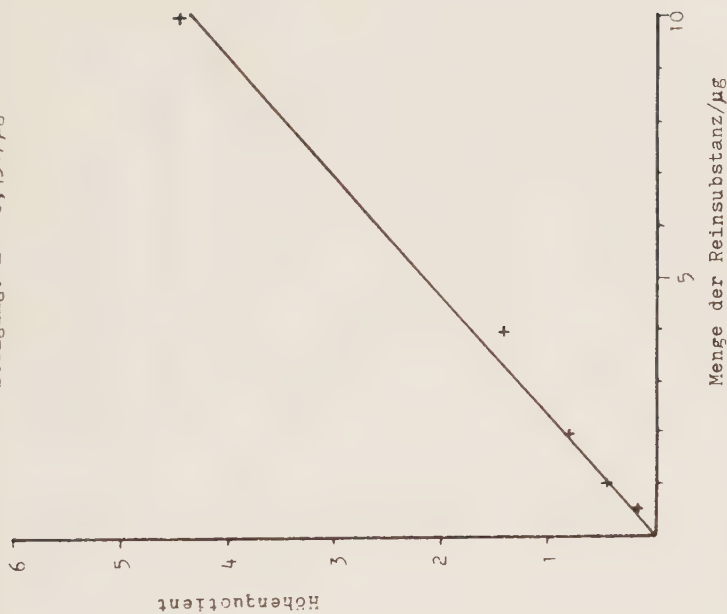
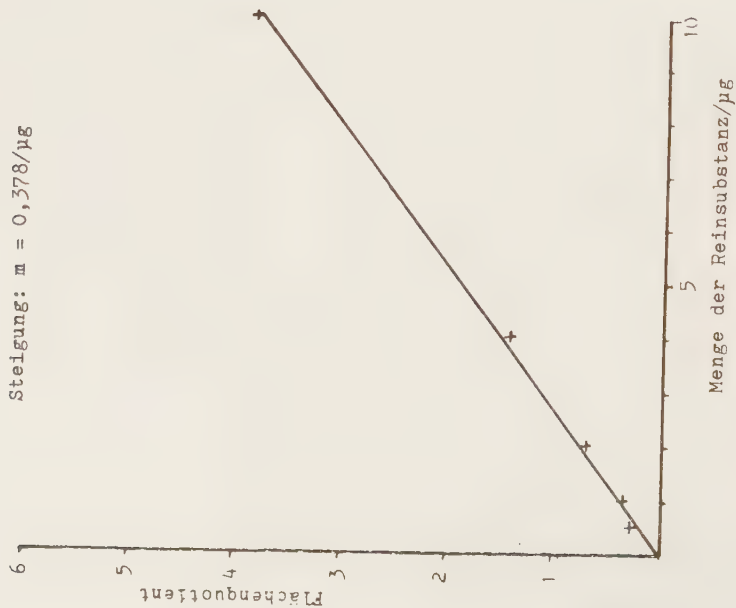


Bild 13: Eichgeraden für Dopamin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz.

Steigung: $m = 0,378/\mu\text{g}$



Steigung: $m = 0,309/\mu\text{g}$

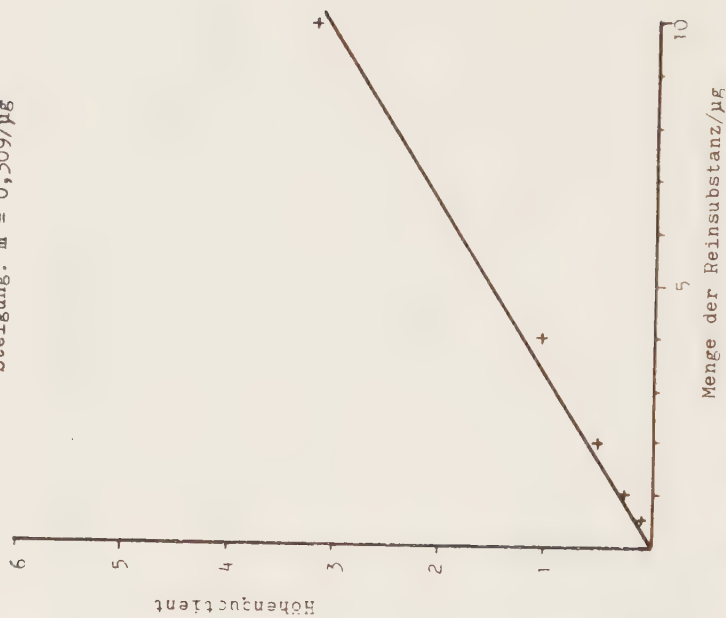
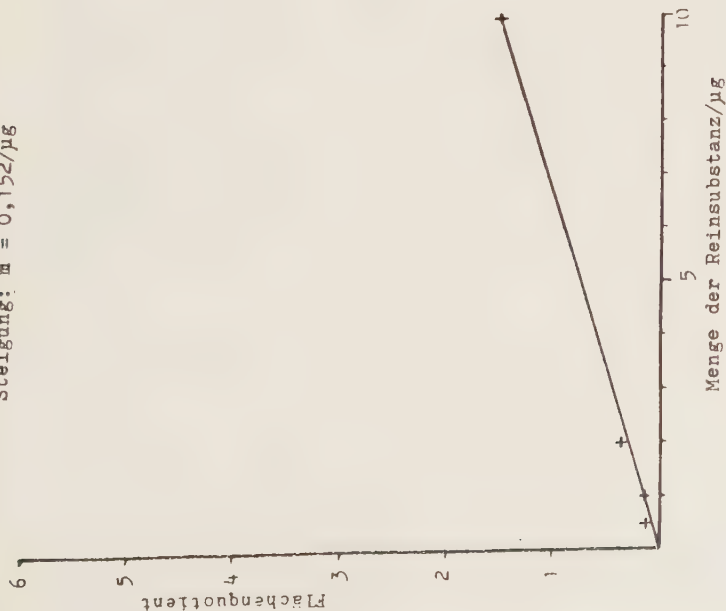


Bild 14: Eichgeraden für Normetanephrin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz

Steigung: $m = 0,152/\mu\text{g}$



Steigung: $m = 0,077/\mu\text{g}$

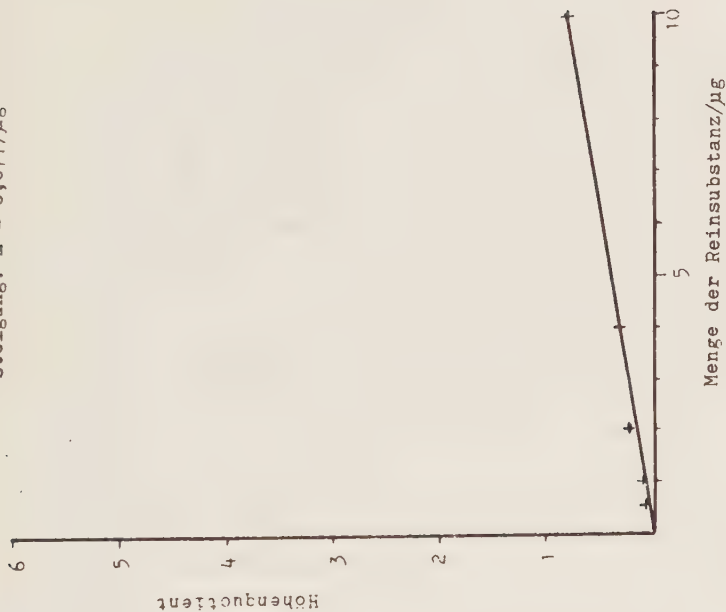
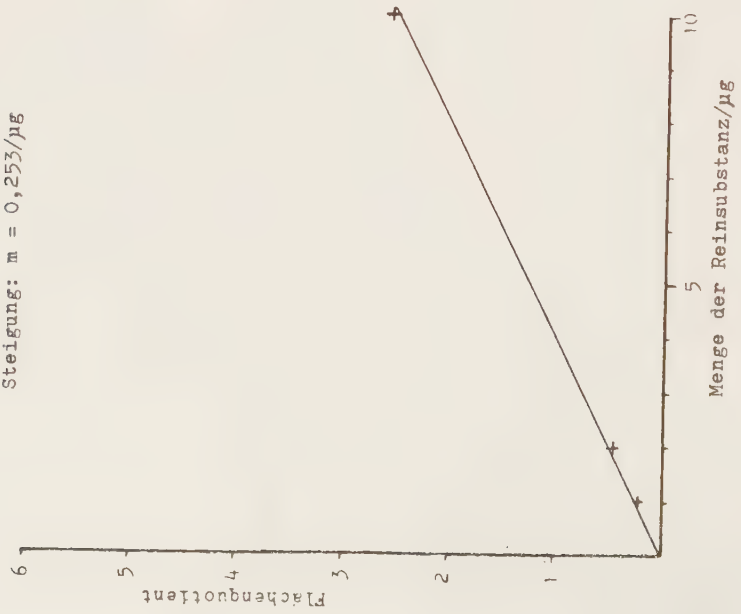


Bild 15: Eichgeraden für Adrenalin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz

Steigung: $m = 0,253/\mu\text{g}$



Steigung: $m = 0,091/\mu\text{g}$

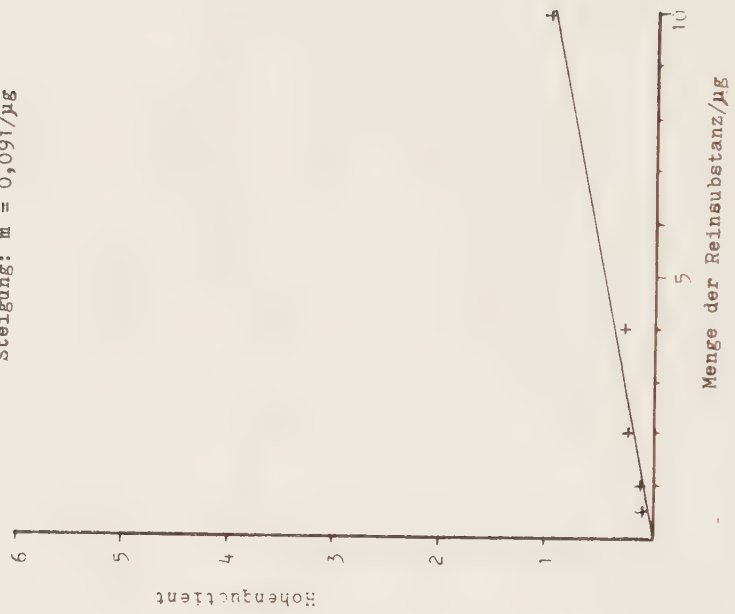


Bild 16: Eichgeraden für Noradrenalin. Flächenquotient bzw. Höhenquotient in Abhängigkeit von der in den Gaschromatographen injizierten Menge der Reinsubstanz.

5.2. Untersuchungen der Blutproben

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit modifizierten Aufbereitungs- und Trennverfahren wurden insgesamt 12 Blutproben analysiert, die entsprechend der Todesart in die Gruppen "Tod durch Herzversagen" und "Tod durch Erhängen" eingeteilt wurden. In jeder Gruppe wurden sechs Proben analysiert. Die relevanten Sektionsdaten sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Der Zeitraum zwischen Tod und Sektion variiert zwischen einem und drei Tagen. Dieser Unterschied hat sich nicht auf die postmortale Diagnostik ausgewirkt, da wie in 2.5. beschrieben wurde, der postmortale Metabolismus der Katecholamine nach wenigen Stunden abgeschlossen sein dürfte und nach HOHLBAUM, 1968 (27), die Hämolyse des Blutes noch nicht wirksam war. Nach der Sektion wurden die Blutproben entweder sofort, d.h. noch am Sektionstag aufbereitet, oder im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt. Es ist nachgewiesen, daß Einfrieren der Blutprobe keinen Einfluß auf die authentischen Aminkonzentrationen hat, HOHLBAUM, 1968 (27).

In Bild 17 bis 20 wurden vier Chromatogramme der zwölf Blutproben wiedergegeben. Der Chromatograph druckte zu jedem Peak die Retentionszeit und die ermittelte Fläche aus. Nur in einzelnen Fällen, in denen vom Chromatographen kein Flächenwert ermittelt wurde, weil der Peak zu klein war, wurde die Höhe des Peaks zur Auswertung herangezogen. Aus den Flächen- bzw. Höhenquotienten wurde mit Hilfe der Steigungen der Eichgeraden die in der 10 ml Blutprobe enthaltene Menge des Amins berechnet. Die Ergebnisse wurden in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt.

Sektions-Nr.:	1037/80	372/80	327/80	143/80	1223/80	101/80
Geschlecht:	- m	ä n n l i c h -		-	-	-
Todeszeitpunkt:	19.7.1980	14.3.1980	4.3.1980	28.1.1980	20.8.1980	19.1.1980
Sektion:	21.7.1980	17.3.1980	5.3.1980	29.1.1980	21.8.1980	21.1.1980
Blut aufgearb. am:	19.8.1980	20.8.1980	21.8.1980	22.8.1980	25.8.1980	26.8.1980
Alter:	43 Jahre	63 Jahre	60 Jahre	46 Jahre	42 Jahre	53 Jahre
Größe:	180 cm	167 cm	170 cm	174 cm	-	183 cm
Gewicht:	80,5 kg	98,2 kg	78 kg	79,5 kg	67,5 kg	108,9 kg
Herzgewicht:	520 g	610 g	662 g	547 g	-	605 g
Todesursache:	Herzversagen bei Herzmuskelhypertrophie - rechts.	Rechtsherzversagen bei Herzhypertrophie (Alkoholiker, Herzinsuffizienz)	Frischer thrombotischer Verschuß des linken absteigenden Herzkranzarterienastes, alte ausgedehnte Infarkt narbe-linke Kammerwand.	Herzversagen bei einer Herzhypertrophie nach Schließunfähigkeit der Aortenklappe, hochgradige Coronarsklerose.	Rechtsherzversagen	Herzversagen bei einer exzessiven Herzhypertrophie und einem nicht mehr frischen Herzinfarkt.

Tabelle 3: Sektionsdaten der Gruppe "Tod durch Herzversagen"

Sektions-Nr.:	1174/80	1170/80	100/80	85/80	1031/80	1070/80
Geschlecht:	- männlich -		-	-	-	-
Todeszeitpunkt:	10.8.1980	10.8.1980	20.1.1980	16.1.1980	19.7.1980	24.7.1980
Sektion:	11.8.1980	11.8.1980	21.1.1980	17.1.1980	21.7.1980	25.7.1980
Blut aufgearb. am:	11.8.1980	12.8.1980	5.8.1980	29.7.1980	21.7.1980	25.7.1980
Alter:	59 Jahre	55 Jahre	23 Jahre	44 Jahre	58 Jahre	45 Jahre
Größe:	179 cm	175 cm	184 cm	160 cm	174 cm	172 cm
Gewicht:	78,2 kg	75 kg	74, 1 kg	69,5 kg	71,1 kg	81,8 kg
Herzgewicht:	473 g	431 g	376 g	415 g	385 g	422 g
Todesursache:	Zentrale Lähmung bei atypischem Erhängen					

Tabelle 4: Sektionsdaten der Gruppe "Tod durch Erhängen"

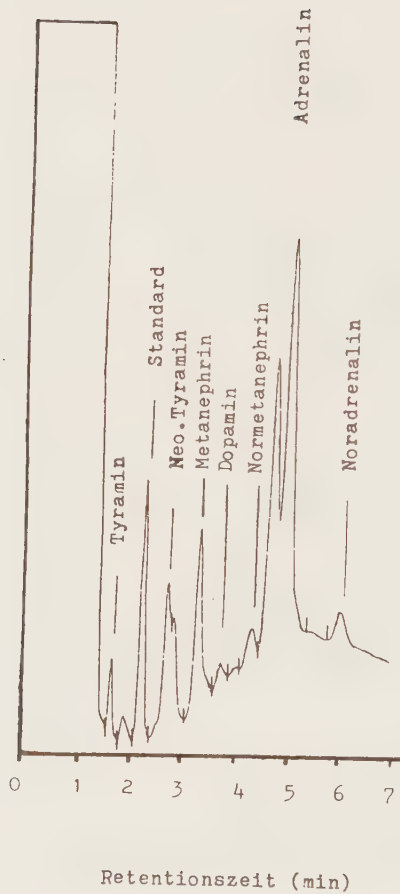


Bild 17: Gaschromatographischer Nachweis von Aminen im Blut
G.S.-Nr. 327/80, Tod durch Herzversagen

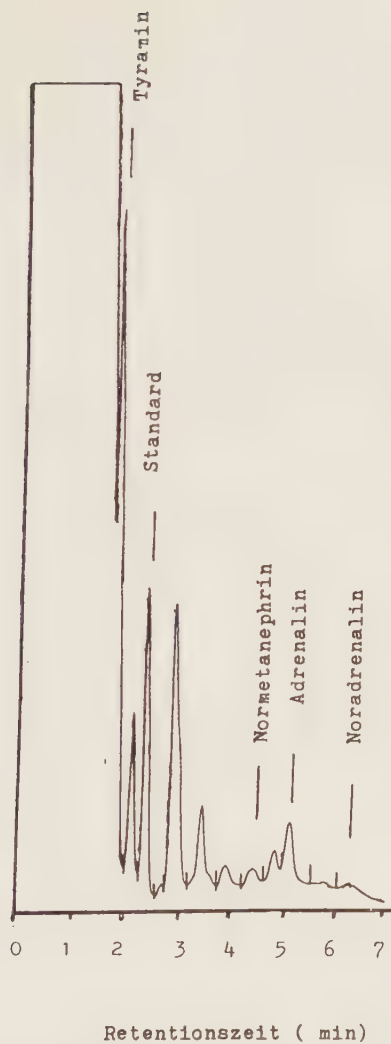


Bild 18: Gaschromatographischer Nachweis von Aminen im Blut
G.S.-Nr. 372/80, Tod durch Herzversagen

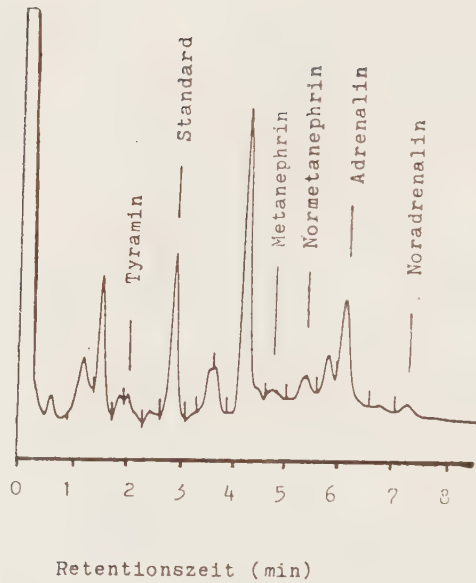


Bild 19: Gaschromatographischer Nachweis von Aminen im Blut
G.S.-Nr. 1170/80, Tod durch Erhängen

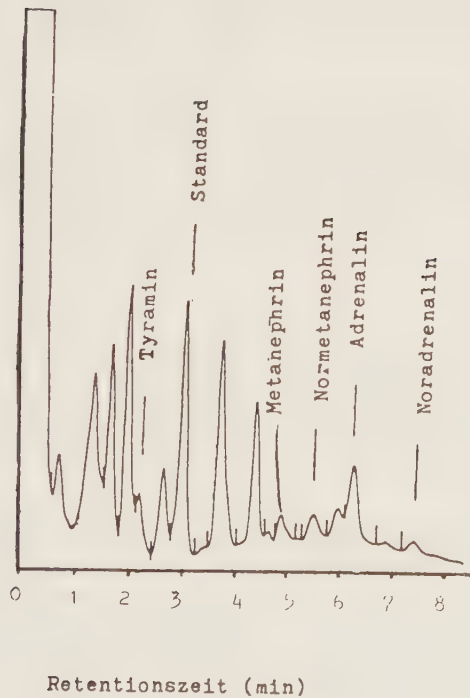


Bild 20: Gaschromatographischer Nachweis von Aminen im Blut
G.S.-Nr. 1031/80, Tod durch Erhängen

6. Diskussion

Aufgrund der Arbeiten von BERG, LUND und LAVES und anderen kann die Existenz von Katecholaminen im Leichenblut und ein Zusammenhang zwischen ihrer Konzentration und der Agonie als gesicherte Erkenntnis gelten. Als entscheidende Einflußgröße für die postmortale Konzentration der Katecholamine wird die zeitliche Dauer der Agonie vermutet. Von BERG, 1963 (4), wurde eine Klassifizierung der verschiedenen Todesarten entsprechend der Dauer der Agonie vorgeschlagen und eine Zuordnung zu experimentell ermittelten Konzentrationen für Adrenalin und Noradrenalin versucht.

Die anderen Autoren bestätigen auf Grund ihrer Untersuchungen im wesentlichen die Hypothese von der Agonie als dem entscheidenden Faktor, geben aber bei gleichen Todesarten zum Teil erheblich - sowohl zu höheren, als auch zu niedrigeren Werten - abweichende Konzentrationen für Adrenalin und Noradrenalin an.

Die Genauigkeit der Analyseverfahren hat bisher nicht ausgereicht, um die Zusammenhänge eindeutig zu klären und damit die postmortale Bestimmung der Katecholamine im Blut als Differenzierungsmethode für Todesursachen in die forensische Diagnostik einzuführen.

Das von KAUERT, 1979 (31) entwickelte Aufbereitungsverfahren für Leichenblut hat sich als sehr wirkungsvoll für die Isolierung und gaschromatographische Trennung der Katecholamine und ihrer basischen Metaboliten erwiesen. Das Verfahren zeichnet sich durch gute Reproduzierbarkeit und eine hohe Wiederfindungsquote aus und könnte deshalb gut für Routineuntersuchungen geeignet sein KAUERT, 1979 (31).

Aus vorhergehenden Untersuchungen ergaben sich aber Hinweise, daß die gaschromatographische Trennung der Amine durch Störsubstanzen beeinträchtigt sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Problem genauer untersucht und durch eine Modifizierung des erprobten Aufbereitungsverfahrens für Blut gelöst.

Bild 7 (rechtes Diagramm) zeigt die Analyse einer Blutprobe, die mit dem unmodifizierten Verfahren aufbereitet wurde. Im Bereich der 4-minütigen Retentionszeit ist eine Spitze mit außerordentlich hohem Flächenquotienten erkennbar. Eine unbekannte Störsubstanz überlagerte die zu dieser Retentionszeit zu erwartende Spitze von Methoxy-Tyramin und verhinderte dessen quantitative Bestimmung.

Durch Reinigung des Ultrafiltrats mit dem in Kapitel 4.2.2.2 beschriebenen Ionenaustauschverfahren wurde die Störsubstanz zuverlässig eliminiert. Alle mit dem modifizierten Verfahren erstellten Analysen waren im Bereich der Retentionszeit 4 min. frei von offensichtlichen Störungen und weitere Überlagerungen traten nicht auf.

Während die Anwendung der Ionenaustauschchromatographie als Reinigungsverfahren zum gewünschten Erfolg geführt hat, konnte mit der Gelchromatographie die Entfernung der Störsubstanz aus dem Ultrafiltrat nicht erreicht werden. Das Scheitern unseres Versuches mit dem Gel Sephadex LH-20 (G-25) kann seine Ursache in nicht optimalen Versuchsbedingungen auf Grund fehlender Kenntnis von der Natur der Störsubstanz haben. Die Größe der Gelpackung bzw. die Höhe der Trennsäule sollte sowohl der Probenmenge als auch dem Unterschied in der Größe der zu trennenden Moleküle angepaßt sein. Bei geringen Molekülgrößenunterschieden kann eine zu kleine Gelpackung oder eine zu geringe Säulenhöhe zu unzureichender Trennung führen,

während ausreichend große Abmessungen Ursache für nicht akzeptable Verdünnung sein könnte. Es erscheint aber nicht als ausgeschlossen, daß auch die Gelchromatographie als Reinigungsverfahren für das Ultrafiltrat anwendbar ist, wenn die Versuchsbedingungen genauer den Erfordernissen angepaßt werden. Die dazu notwendigen Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Mit der modifizierten Aufbereitungsmethode wurden 12 Blutproben analysiert. In den Tabellen 5 und 6 wurden die Ergebnisse für die beiden untersuchten Fallgruppen "Tod durch Erhängen" und "Tod durch Herzversagen" zusammengefaßt. Auffällige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind nicht festgestellt worden. Die Sektionsberichte enthielten keine Angaben zur Dauer der jeweiligen Agonie, so daß eine entsprechende Bewertung der Ergebnisse nicht möglich war.

Die von uns ermittelten Gruppenmittelwerte für Adrenalin (11,23 ng/ml bei Herztod bzw. 4,16 ng/ml bei Tod durch Erhängen) lagen deutlich höher als der beim lebenden Organismus unter Normalbedingungen gefundene Wert von 0,0-0,3 ng/ml, LUND, 1951 (42). Sie waren aber kleiner als die von BERG, 1966 (5) berichteten Werte für Herzinfarkt (89,5 ng/ml) und Erstickungen (79,5 ng/ml). Vom gleichen Autor wurden an anderer Stelle sogar 135 ng/ml bei Herztod und 197 ng/ml bei äußerer Erstickung angegeben, BERG, 1973 (6). Bei HOHLBAUM, 1968 (27), streuten die Adrenalinwerte bei Herztod zwischen 14 und 44 ng/ml für Agonien mit einer Zeitdauer im Sekunden-Minuten-Bereich und zwischen 35 und 260 ng/ml für Agonien im Minuten-Stunden-Bereich. Für den Tod durch Erhängen wurden Werte zwischen 44 und 93 ng/ml angegeben.

Ein Vergleich der von uns gefundenen Konzentrationen für Noradrenalin mit Ergebnissen der bereits genannten Autoren

Blut- probe	Tyramin	Metoxy- tyramin	Meta- neph rin	Dopamin	Normeta- neph rin	Adrenalin	Nor- adrenalin
143/80	0,468	-	-	-	-	23,92	3,28
1223/80	0,172	-	-	-	1,1	8,13	1,14
101,80	-	-	0,02	-	0,584	5,63	0,99
1037/80	6,85	-	0,11	-	0,34	3,87	0,40
372/80	1,23	-	-	-	0,47	4,95	0,34
327/80	0,39	0,13	0,69	0,002	0,03	20,89	2,46
Mittelwert	1,518	0,02	0,137	0,0003	0,42	11,23	1,43
Standard- abweichung	2,41	0,048	0,25	0,0007	0,3119	8,05	1,08
Variations- koeffizient	159	242,24	182,85	248,45	88,37	71,7	75,68

Tabelle 5: Konzentrationen der biogenen Amine im Blut nach Tod durch Herzversagen.
Konzentrationsangaben in ng/ml.

Blut- probe	Tyramin	Metoxy- tyramin	Meta- neph rin	Dopamin	Normeta- neph rin	Adrenalin	Nor- adrenalin
1174/80	0,79	0,2	0,06	0,04	0,56	0,46	0,36
1170/80	0,07	-	0,04	-	0,7	10,66	2,28
100/80	-	-	0,17	-	0,61	2,05	0,21
85/80	0,13	0,2	-	-	0,75	1,87	0,03
1031/80	0,09	-	0,024	-	0,36	4,47	0,53
1070/80	1,12	-	-	-	0,18	5,47	0,48
Mittelwert	0,367	0,08	0,049	0,015	0,527	4,16	0,65
Standard- abweichung	0,428	0,0979	0,058	0,015	0,198	3,34	0,75
Variations- koeffizient	116,76	122,47	118,36	100,0	37,62	80,59	115,80

Tabelle 6: Konzentrationen der biogenen Amine im Blut nach Tod durch Erhängen.
Konzentrationsangaben in ng/ml.

ergab noch größere Unterschiede als beim Adrenalin. Bei allen von uns analysierten Fällen war die Noradrenalin-Konzentration niedriger als die Adrenalin-Konzentration, während in der Literatur beide Amine mit ähnlich hohen Konzentrationen angegeben wurden.

Dopamin wurde bei unseren Untersuchungen nur in zwei Blutproben und nur in sehr geringer Konzentration (0,002 ng/ml und 0,04 ng/ml) gefunden. VAN LOON, 1980 (62), hat für freies Dopamin im Plasma bei normalen, ruhenden Personen eine Konzentration von 0,054 ng/ml ermittelt. Er weist darauf hin, daß Dopamin zu mehr als 95 % in konjugierter Form vorzuliegen und die Umwandlung von freiem Dopamin in die konjugierte Form sehr rasch zu erfolgen scheint. Seine Untersuchungen zeigen ferner, daß bei körperlicher Belastung und Stress die Konzentration von Dopamin im Plasma zwar prozentual im vergleichbaren Umfang ansteigt wie bei Adrenalin und Noradrenalin, wegen des erheblich kleineren Basiswertes bei Dopamin aber der Anstieg im Absolutwert der Konzentration erheblich geringer ist. Die fehlenden Nachweise für Dopamin im Plasma im Rahmen unserer Untersuchungen könnten ihre Erklärung finden in einer für die geringe Dopaminkonzentration unzureichenden Empfindlichkeit unseres Aufbereitungs- und Meßverfahrens

7. Zusammenfassung

Es ist bekannt, daß die postmortal gemessenen Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin im Blut stark erhöht sind und deshalb die Agonie als eine übersteigerte Form des Stressses angesehen werden kann. Für die Gerichtsmedizin wäre es von besonderer Bedeutung, wenn aus dem Katecholaminblutspiegel Rückschlüsse auf die Dauer der Agonie gezogen und die Diagnose der Todesursache abgesichert werden könnte.

Aus den im theoretischen Teil dieser Arbeit dargestellten Zusammenhängen des Katecholamin-Stoffwechsels wird ersichtlich, daß es nicht ausreichend ist, sich beim Studium der biochemischen Reaktionen auf die Analyse von Adrenalin und Noradrenalin zu beschränken. Das von KAUERT, 1979 (31) entwickelte Verfahren der extraktiven Derivatisierung der Katecholamine in Verbindung mit der gaschromatographischen Trennung bietet die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der wichtigsten Katecholamine und ihrer Metaboliten. Die ersten Versuche mit dem neuen Verfahren zeigten, daß bestimmte Bereiche des KA-Spektrums durch unbekannte Störsubstanzen verfälscht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode gefunden werden, mit der die KA als Gesamtheit von anderen unerwünschten Substanzen abgetrennt werden können. Unser Versuch, durch Gelchromatographie eine Reinigung der Blutprobe zu erreichen, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Es kann vermutet werden, daß auf Grund von fehlender Kenntnis der Eigenschaften der Störsubstanz nicht die optimalen Versuchsbedingungen bzgl. Größe der Gelpackung und Höhe der Trennsäule gefunden wurden.

Die Abtrennung der Störsubstanz gelingt aber aufgrund der Polarität der KA mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. Um die Probleme der Verdrängung der Aminogruppen aus ihrer Bindung an den schwach basischen Ionenaustauscher zu umgehen, werden die Amine in dieser Bindung durch Propionylierung extraktiv derivatisiert. Mit dem erweiterten Aufbereitungsverfahren werden 12 Blutproben analysiert und die Wirksamkeit der Modifikation demonstriert.

8. Literaturverzeichnis

1. AVAKIAN, O.M. and SHIRINIAN, E.A. (1976): The sympatho-adrenal system and haemorrhagic shock
In: USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.J.: Catecholamines and Stress, 475 - 482 (1976)
Pergamon Press, New York, 475 - 482 (1976)
2. AXELFORD, J. (1966): Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines
Pharmacol. Rev., Baltimore, 18, 95 - 113 (1966)
3. BERG, S. (1950): Das postmortale Verhalten des Blutes
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 40, 1 - 75 (1950)
4. BERG, S. (1963): Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut als Ausdruck des Totgeschehens
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 54, 136 - 149 (1963)
5. BERG, S. (1966): Adrenalin- und Noradrenalinwerte im Blut bei gewaltsamen Todesursachen
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 179 - 183 (1966)
6. BERG, S. and BONTE, R. (1973): Catecholaminwerte im Leichenblut und -liquor bei verschiedenen Agonieformen
Z. Rechtsmed. 72, 56 - 62 (1973)
7. BERTEL, and BÜHLER, F.R. and STEINER, A. (1978): Vielfach gesteigerte Plasmakatecholaminwerte bei Myokardinfarkt mit Kammerflimmern
Schweiz. med. Wschr. 108, 1729 - 1731 (1978)
8. BHAGAT, B.D. and HORENSTEIN, S. (1981): Modulation of adrenal medullary enzymes by stress
In: USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.J.: Catecholamines and Stress
Roven Press, New York, 257 - 264, (1981)

9. BRISSE, B. (1976): Katecholaminstoffwechsel
Fortschr. Med. 94, 1233 - 1237 (1976)
10. BRONSTEIN, and SEMENDJAJEW, K.A. (1967): Taschenbuch der
Mathematik
Harri Deutsch Verlag, Frankfurt (1967)
11. CARLSSON, A. and WINBLAD, B. (1976): Influence of age
and time interval between death and autopsy
on dopamin and 3-methoxy-tyramin levels in
human basal ganglia
J. Neur. Transm. 38, 271 - 276 (1976)
12. CHU, N.S. and BLOOM, F.E. (1973): Norepinephrine-contain-
ing neurons: changes in spontaneous discharge
patterns during sleeping and waking
Science 179, 908 (1973)
13. COOPER, D. and STOLK, J.M. (1977): Strain defferences in
dopamin- β -hydroxylase activity following immo-
bilisation stress
The Pharmacologist 19, 238 (1977)
14. DENBSKY, G. and FISCHER, H. (1972): Postmortaler Adrenalin-
Gehalt im Blut
Münch. med. Wschr. 114, 1993 - 1996 (1972)
15. DETTERMANN, H. (1967): Gelchromatographie, Gelfiltration,
Gelpermeation, Molekülsiebchromatographie
Springer Verlag, Berlin (1967)
16. DREWES, A. and KOWALSKI, A.J. (1974): Some Marker Dyes
for Locating Steroids Eluted from Sephadex
LH-20 columns
Clin. Chem. 20, 1451 - 1453 (1974)

17. FAIMAN, M.D. and MYERS, M.B. and SCHOWEN, R.L. (1973):
Post-mortem degradation kinetics of brain nor-
epinephrine
Bioch. Pharmac. 22, 2171 - 2181 (1973)
18. FÜRSTER, H. and LACKO, L. (1975): Physiologische Chemie
F. Enke Verlag, Stuttgart (1975)
19. FREWIN, D.B. and HUME, W.R. and WATERSON, J.G. and
WHELAN, R.F. (1971): The histochemical localisation of
sympathetic nerve endings in human gingival
blood vessels
Aust. J. exp. med. 42, 573 - 580 (1971)
20. GANONG, W.F. (1979): Lehrbuch der medizinischen Physiologie
Springer Verlag, Berlin (1979)
21. GESSLER, U. and HAAN, D. (1970): Pathogenese, Klinik,
Prophylaxe, Therapie des Schocks
Supl. zur Zschr.: Wiederbelebung-Organersatz-
-Intensivmedizin (1970)
22. GOSTOMZYK, J.G. and FREI, G.F. (1969): Unveresterte freie
Fettsäuren im Serum und agonales Kreislaufver-
sagen
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 7, 505 - 508
(1969)
23. GROSSE und BROCKHOFF, (1969): Pathologische Physiologie
New York, 232 (1969)
24. HARPER, H.A. and LÖFFLER, G. and PETRIDES, P.E. and WEISS, L.
(1975): Physiologische Chemie
Springer Verlag Berlin, (1975)

25. HELFERICH, F. (1959): Ionenaustauscher
Chemie Verlag, Weinheim/Bergst. (1959)
26. HIEMKE, CH. (1977): Untersuchungen zur Isolierung und
gaschromatographischen Bestimmung von Katechol-
aminen, Serotonin und deren basischen Metaboliten
Inaugural-Dissertation, Bonn (1977)
27. HOHLBAUM, K. (1968): Der Adrenalin-Noradrenalin-Quotient
im Leichenblut bei forensisch wichtigen Todes-
ursachen
Diss. Med. Universität Göttingen (1968)
28. HOLZ, P. and PALM, D. (1966): Ergebnisse der Physiologie,
biologischen Chemie und experimentellen Pharma-
kologie
Springer Verlag, Berlin (1966)
29. KAISER, G.G. and JELINEK, M. and COOPER, T. and HANLON, C.R.
(1965): Experimental heart block-effect on myo-
cardial catecholamine concentration
Am J. Physiology 208, 477 - 479 (1965)
30. KAUERT, G. (1977): Isolierung und Gaschromatographisch-massen-
spektrometrische Bestimmung biogener Amine des
Katechol- und Indolalkylaminstoffwechsels aus
Urin
Inaugural-Dissertation, Bonn (1977)
31. KAUERT, G. and HIEMKE, C. and KALBHEN, D.A. (1979): Gas-
chromatographische Untersuchungen biogener Amine
in Form ihrer Acetyl-, Propionyl-, n-Butyryl-,
iso-Butyryl- und Pivaloylderivate
Chromatographia 12, 226 - 230 (1979)

32. KOBAYASKI, R.M. and PALKOVITS, M. and KIZER, J.S. and JACOBOWITZ, D.M. and KOPIN, I.J. (1976): Selective alterations of catecholamines and tyrosin hydroxylase activity in the hypothalamus following acute and chronic stress
In: USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.R.: Catecholamines and Stress
Pergamon Press, New York, 29 - 38 (1976)
33. KOKAVEC, M. and BARTA, E. and KRSEK, H. and BIALIK, V. and NEUWERTH, A. (1968): Anteil der Nebennieren an der Entstehung einiger Veränderungen des Blutes während der mechanischen Asphyxie
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 64, 49 - 55 (1968)
34. KORF, J. and AGHAJANIAN, G.K. and ROTH, R.H. (1973): Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus
Neuropharmacology 12, 933 - 938 (1973)
35. KVETNANSKY, R. (1973): Transsynaptic and humoral regulation of adrenal catecholamine synthesis in stress
In: USDIN, E. and SNYDER, S.: Frontiers in catecholamine research
Pergamon Press, New York, 223 - 229 (1973)
36. KVETNANSKY, R. and SUN, C.L. and TORDA, T. and KOPIN, I.J. (1977): Plasma epinephrine and norepinephrine levels in stressed rats - effect of adrenalectomy
The Pharmacologist 19, 241 (1977)
37. KVETNANSKY, R. and WEISSE and KOPIN, I.J. (1973):
In: USDIN, E. and KOPIN I.J. and BARCHER, (1979): Catecholamines Basic and clinical frontier
Pergamon Press, New York (1979)

38. LAVES, W. and BERG, S. (1963): Agonie, physiologisch-chemische Untersuchungen bei gewaltsamen Todesarten
Max-Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck (1963)
39. LIDBRINK, P. and CORRODI, H. and FUXE, K. and OLSON, L. (1972): Barbiturates and meprobamate: decreases in catecholamine turnover of central dopamin and noradrenaline neuronal systems and the influence of immobilization stress
Brain Res. 45, 507 - 510 (1972)
40. LILLEHEI, R.T. and LONGERBEAM, I.K. and ROSENBERG, I.C. (1962): Das Wesen des irreversiblen Schocks. Schock, Pathogenese und Therapie
Thieme Verlag, Stuttgart, 118 - 130 (1962)
41. LITTLE, R.A. and FRAYN, K.N. and RANDALL, P.E. et. al (1985): Plasma catecholamines in patients with acute myocardial infarktion and in cardiac arrest
Quart J. Med. 214, 133 - 140, (1985)
42. LUND, A. (1951): Adrenalin and noradrenalin presence in the organism, secretion and elimination
Dissertation Copenhagen - Einar Munksgaard (1951)
43. LUND, A. (1964): Adrenalin and Noradrenalin in post-mortem blood
Med. Sci. Law 4, 194 - 199 (1964)
44. MATLINA, E. SH. (1976): Main phase of CA-metabolism under stress
In: USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.J. (1976): Catecholamines and Stress
Pergamon Press, New York, (1976)

45. MAYNERT, E.W. and KURIYAMA, K. (1964): Some observations on nerve-ending particles and synaptic vesicles
Life Sci. 3, 1067 - 1087 (1964)
46. MC GEER, E.G. and MC GEER, P.L. and WADA, J.A. (1971):
Distribution of tyrosin hydroxylase in human
and animal brain
J. Neurochem. 18, 1647 - 1658
47. MIETKIEWSKI, E. et al. (1959): Metabolische Aspekte des Schocks
In: Schock, Pathogenese und Therapie
Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
48. MÜLLER, B. (1975): Gerichtliche Medizin, Teil 1
Springer Verlag, Berlin (1975)
49. NEGOWSKI, W.A. (1959): Pathophysiologie und Therapie der Agonie und des klinischen Todes
Akademie Verlag, Berlin (1959)
50. NETAL, R. (1982): Untersuchungen zur Isolierung und gas-chromatographischen Bestimmung von Katecholaminen und ihren basischen Metaboliten aus Leichenblut
Inaugural-Dissertation, München (1982)
51. PLETSCHER, A. (1972): Regulation of catecholamines turnover by variations of enzymes levels
Pharmacol. Rev. 24, 225 - 232 (1972)
52. PONSOLD, A. (1961): Erstickung
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 51, 333
53. SCHACHT, U. and GERHARDS, H.J. (1979): Synapsen und Psychopharmaka
Med. in u. Zeit 2, 54 - 63 (1979)

54. SCHWEITZER, H. (1952): Zur Pathogenese der Schockzustände und ihrer Diagnose an der Leiche
Ärztl. Forschung 6, 76 - 78 (1952)
55. SCHEIDT, S. and ASCHEIM, R. and KILLIP, T. (1970): Shock after acute myocard Infarction
Am. J. Cardiol., 556 - 563 (1970)
56. SERRANO, P.A. and MONROY, J.R. and RAMIREZ DEL ANGEL, A. and LARA, B.C. and LERDO DE TEJADA, A. (1966): Changes of tissue serotonin and catecholamine concentrations after asphyxia and anoxia
Dis Chest 49, 507 - 511
57. STONE, E.A. (1975): Stress and catecholamines
In: FREIDHOFF, A.J.: Catecholamines and behaviour
Plenum Press, London, 2, 31 - 72 (1975)
58. SULTANOV, F.F. (1976): Catecholamines and heat stress
In: USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, J.I.: Catecholamines and Stress
Pergamon Press, New York, 435 (1976)
59. UDENFRIED, S. (1966): Tyrosin hydroxylase
Pharmac Rev. 18, 43 - 51 (1966)
60. USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.J. (1976): Catecholamines and Stress
Pergamon Press, New York, (1976)
61. USDIN, E. and KVETNANSKY, R. and KOPIN, I.J. (1980): Catecholamines and Stress: Recent Advances
Developn. in neuroscience 8, Elseveer/North-Holland (1980)

62. VAN LOON, G.R. and SOLE, M.J. (1980): Plasma Dopamine: Source, Regulation, and Significance
Metabolism, 29, Suppl. 1 (November), 1119 - 1123
1980
63. VENDSALU, A. (1960): Studies on adrenalin and noradrenalin in human plasma.
Acta phy Scand. 49, 173 (1960)
64. VERRAGUT, and SIEGENTHALER, U. F. and GRUBER (1973):
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag, Stuttgart (1973)
65. WALTER, K.H. (1981): Agonale und postmortale Veränderungen des Katecholaminstoffwechsels
Inaugural Dissertation, München (1981)
66. WORTSMAN, J. and FRANK, S. and CRYER, P.E. (1984): Adrenomedullary response to maximal stress in humans
Am.J. Med. 77, 774 - 784 (1984)
67. YLIKAHRI, R.H. (1979): Cardiac Metabolism in Myocardial Ischaemic
Anals Clin. Res., 1979

8. Lebenslauf

Name:	Helena Dettmar, geb. Skalík
Geburtsdatum:	18.05.1951
Geburtsort:	Jeseník/CSSR
Umsiedlung in die BR Deutschland :	18.11.1969
Heirat:	3. 9.1979
Geburt des Sohnes:	8. 8.1981
Geburt der Tochter:	23. 3.1985
Schulbildung:	1957 - 1966 Volksschule in Blansko/CSSR 1966 - 1969 Gymnasium in Blansko/CSSR Reifeprüfung: 22.09.1969 1970 - 1971 Wirsberg-Gymnasium in Würzburg zur Vorbereitung auf das deutsche Abitur Reifeprüfung: 13.07.1971
Studium:	WS 71/72 Universität Würzburg Geographie, Russisch für das Lehramt an Realschulen SS 73 Universität Frankfurt Geographie, Russisch für das Lehramt an Realschulen WS 73/74- SS 76 Universität München Geographie, Wirtschaftswiss. für das Lehramt an Realschulen SS 77 - WS 82/83 Universität München Zahnmedizin Bestellung als Zahnarzt: 27.1.1983

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W. Spann danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität München durchzuführen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Kauert danke ich für viele wertvolle Anregungen und große Hilfsbereitschaft, sowie die ausdauernde Betreuung während der experimentellen Studien.

